

Université de Montréal

DÉVELOPPEMENT DE CONSTRUCTIONS ANTISENS ET siRNA POUR
SUPPRIMER L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR IGF-IR :
APPLICATION A LA THÉRAPIE DU CANCER

par
Christel Dias

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maître ès Sciences (M.Sc) en Microbiologie et Immunologie

Avril 2005

Droits réservés à Christel Dias, 2005



(1)

4

U58

2.01.17

V 101

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT DE CONSTRUCTIONS ANTISENS ET siRNA POUR
SUPPRIMER L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR IGF-IR :
APPLICATION A LA THÉRAPIE DU CANCER

présenté par :
Christel Dias

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Lemay, Ph.D
Bernard Massie, Ph.D.
Anne-Marie Mes-Masson, Ph.D.

RÉSUMÉ

La transformation maligne est communément associée à une expression et/ou une fonction altérée de facteurs de croissance, de leurs récepteurs ou des voies de signalisation impliquées. Cibler la signalisation par les facteurs de croissance dans les tumeurs a été proposé comme une approche prometteuse dans le traitement du cancer et des métastases. Le récepteur IGF-IR est impliqué dans l'acquisition du phénotype transformé et identifié comme un régulateur positif de la survie et de la croissance cellulaires dans des types de tumeurs variées.

L'objectif de cette étude était de développer des méthodes de criblage rapides afin de faciliter l'identification de molécules qui inhiberaient spécifiquement et de façon optimale IGF-IR. Une de ces méthodes était basée sur la sélection rapide d'ARNs antisens ciblant efficacement IGF-IR. La méthode était basée sur la construction d'une librairie adénovirale (AdV) d'antisens dans laquelle la croissance uniquement d'AdVs recombinants était assurée par la sélection positive basée sur l'expression ectopique du gène de la protéase (PS) dans la région E1. Nous avons par conséquent généré deux cents clones de la librairie adénovirale exprimant des fragments d'ARN antisens à IGF-IR. L'effet antisens a été mesuré en utilisant une méthode de criblage rapide basée sur la co-expression d'IGF-IR et des clones de la librairie suivi de l'évaluation du niveau de protéine IGF-IR.

La deuxième méthode se basait sur le phénomène de l'ARN interférence. Des « Small hairpin RNAs » (shRNAs) ciblant IGF-IR ont été clonés dans une cassette d'expression U6 dans des vecteurs adénoviraux. L'effet relatif d'inhibition par les shRNAs a été mesuré par une méthode rapide basée sur la co-expression d'IGF-IR/gène rapporteur et de shRNA suivi d'une évaluation des niveaux d'expression du gène rapporteur. Les ARNs antisens et les shRNAs les plus efficaces furent ensuite testés sur le récepteur endogène de deux lignées cellulaires murines par infection par des adénovirus recombinants. Nous avons comparé l'efficacité relative d'inhibition des shRNAs et des ARNs antisens utilisés pour le criblage sur le transgène IGF-IR et sur la cible endogène. Un de nos shRNAs trouvé comme étant le plus efficace dans le test utilisant le gène rapporteur, réduisait fortement l'expression du récepteur endogène dans les deux lignées testées. Afin de tester si l'efficacité de ce shRNA pouvait être influencée par le mode de livraison, nous l'avons aussi cloné dans un vecteur lentiviral exprimant un gène rapporteur dans une cassette d'expression séparée. En raison d'une faible efficacité de transduction, une sélection clonale fut entreprise et chaque clone obtenu exprimait des niveaux de réduction variables d'IGF-IR. Afin de confirmer la stabilité du shRNA et afin de contourner les limites d'efficacité de transduction, des expériences

supplémentaires sont requises. Les molécules ainsi développées pourront servir d'outils puissants en thérapie génique.

Mots clés : IGF-IR, métastase, librairie adénovirale, ARN interference, ARN antisens, shRNA, vecteur lentiviral, vecteur adénoviral, thérapie génique.

ABSTRACT

Malignant transformation is commonly associated with altered expression and/or function of growth factors, their receptors or the involved signaling pathways. Targeting growth factors signalisation in tumors has been suggested as promising approach for cancer treatment and metastasis. The receptor IGF-IR has been implicated in the acquisition of the transformed phenotype and identified as a positive regulator of cell survival and growth in a range of tumor types.

The challenge of this study was to develop fast screening methods in order to identify molecules that specifically and optimally silenced IGF-IR expression. One of these methods was designed for rapid selection of antisense RNAs efficiently targeting IGF-IR. The method was based on construction of adenoviral (AdV) antisense library where growth of only AdV recombinants was assured by positive selection based on ectopic expression of viral protease (PS) in the E1 region. We therefore generated two hundred adenoviral library clones expressing IGF-IR antisense RNA fragments. The antisense effect was measured by rapid screening method based on co-expression of IGF-IR and library clones followed by the evaluation of the level of IGF-IR protein.

The second method was based on RNA interference phenomenon. Small hairpin RNAs (shRNA) targeting IGF-IR were cloned in U6 expression cassette in adenoviral vectors. The relative shRNAs silencing effect was measured by rapid method based on co-expression of IGF-IR/reporter gene and shRNA expressed by recombinant adenoviruses and followed by evaluation of the reporter expression levels. The most efficient RNAs antisense and shRNAs were further tested against the endogenous receptor of two murine cell lines by recombinants adenoviruses infection. We compared the relative efficacy of shRNAs and antisense RNAs used for the screening on the transgene IGF-IR and on the endogenous target. One of our shRNA found to be highly efficient in the reporter based assay reduced dramatically the expression of the endogenous receptor in both cell lines tested. To test if the efficiency of this shRNAs could be influenced by the mode of delivery we also cloned it in a lentiviral vector expressing a reporter gene in a separate expression cassette. As a consequence of the low efficiency of transduction obtained, a clonal selection was performed and each single clone obtained displayed varying level of reduction of IGFI-R. To confirm the stability of the shRNA and to overcome transduction efficiencies limits further experiments are required.

These developed molecules could serve as potent tools in gene therapy.

Key words: IGF-IR, metastasis, adenoviral library, antisense RNA, RNA interference, shRNA, lentiviral vector, adenoviral vector, gene therapy.

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser tous mes remerciements au Dr Bernard Massie pour m'avoir fait confiance et m'avoir acceptée dans son laboratoire ainsi qu'à toutes les personnes du laboratoire pour avoir répondu à mes questions avec le sourire. Je ne remercierai jamais assez mes amis pour leur présence, leurs conseils et biensûr ma famille, mes parents, ma sœur, pour tout, je ne serai pas arrivée jusque là sans votre immense soutien.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
REMERCIEMENTS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
1-INTRODUCTION.....	1
1-1 Les métastases : un obstacle à la guérison du cancer.....	2
1-1-1 Les principales étapes dans le processus de formation des métastases: pathogenèse.....	2
1-1-2 Les déterminants critiques dans la formation des métastases.....	3
1-2 Les apports de la thérapie génique en cancérologie.....	5
1-2-1 La livraison du matériel génique dans les cellules cibles.....	6
1-2-1-1 Les vecteurs adénoviraux (AdVs).....	6
1-2-1-2 Les vecteurs lentiviraux (LVs).....	12
1-2-2 La découverte de l'ARNi révolutionne la génétique traditionnelle.....	17
1-2-2-1 Le mécanisme de l'ARNi.....	18
1-2-2-2 Le rôle de l'ARNi dans le contrôle de l'expression génique.....	21
1-2-3 Les siRNA : de nouveaux outils pour la thérapie génique.....	22
1-2-3-1 Les siRNAs : des outils pour le criblage génétique.....	22
1-2-3-2 Les siRNAs : un potentiel thérapeutique.....	23
1-3 Les facteurs de croissance et leurs récepteurs : des cibles potentielles pour la thérapie anti-tumorale.....	24
1-3-1 Le système IGF : les composantes.....	26
1-3-2 Le récepteur IGF-I.....	26
1-3-2-1 Structure.....	27
1-3-2-2 Transduction du signal : fonction pléiotropique d'IGF-IR.....	28
1-3-3 Les aspects pathophysiologiques de l'action de IGF-IR/IGF-I : implication dans l'acquisition du phénotype tumoral et métastatique.....	32
1-3-3-1 Effet mitogénique de IGF-IR.....	32

1-3-3-2 Les données épidémiologiques.....	33
1-3-3-3 Effet transformant et protection contre l'apoptose.....	34
1-3-3-4 Rôle de IGF-IR dans les métastases.....	35
1-4 Les stratégies d'inhibition de l'expression de IGF-IR.....	37
1-4-1 Les stratégies ciblant l'ARN.....	39
1-4-1-1 ODNs et ARN antisens.....	39
1-4-1-2 Les ribozymes.....	40
1-4-1-3 Les siRNA.....	41
1-4-2 Efficacité comparée des siRNA et des ARNantisens : des problèmes communs.....	41
1-5 Hypothèse et objectif de recherche.....	44
2-MATERIEL ET METHODES.....	45
2-1 Construction de plasmides.....	46
2-1-1 Construction des plasmides pAdCMV5-P2DC-IGFIR-S-GFPq/MLP-PS, pAdCMV5-P2DC-IGFIR-AS(PL)-GFPq/MLP-PS et pAdCMV5-P2DC-IGFIR-AS(309)- GFPq/MLP-PS.....	46
2-1-2 Construction du plasmide pAdCMV5DsRed/U6hp2/MLP-PS.....	52
2-1-3 Construction du plasmide pRRL.cPPT/U6Hp2/CMV5DsRed2-N1-WPRE.....	55
2-2 Les lignées cellulaires utilisées et méthodes de transfection.....	60
2-2-1 Les lignées cellulaires utilisées.....	60
2-2-2 Méthode de transfection.....	60
2-2-3 Construction de la lignée cellulaire 293CymRIGFI-R.....	61
2-3 Production virale.....	62
2-3-1 Génération d'adénovirus recombinants par la sélection positive avec la protéase adénovirale.....	62
2-3-2 Titrage des stocks viraux par cytofluorométrie.....	65
2-3-3 Génération de Lentivirus SIN et de populations stables exprimant le gène d'intérêt.	67
2-4 Contrôle de l'expression génique.....	68
2-5 Immunobuvardage.....	70
2-6 Génération d'une librairie adénovirale de fragments antisens IGFI-R utilisant la sélection positive.....	72
2-6-1 Préparation de la librairie plasmidique pour la transfection.....	72

2-6-2 Protocole d'infection/transfection afin de générer une librairie adénovirale.....	73
2-6-3 Détermination du titre viral approximatif de la librairie par essai de plages.....	73
2-6-4 Isolement des clones viraux antisens individuels.....	74
2-6-5 Amplification des clones viraux individuels.....	74
2-7 Essais de criblage de la librairie adénovirale.....	75
2-7-1 Sur un modèle réplcatif : 293CymRIGF-IR.....	75
2-7-2 Criblage sur un modèle non-rélicatif : HeLa.....	76
2-8 Construction et analyse de l'efficacité de shRNA.....	77
2-8-1 Clonage de shRNAs.....	77
2-8-2 Analyse de l'expression de la GFP et de la RFP par cytométrie en flux.....	79
3-RESULTATS.....	81
3-1 Expression de IGFI-R et validation des constructions pAdIGF-IR(S) et pAdIGF-IR(AS).....	82
3-2 Construction et validation de la lignée 293CymRIGF-IR.....	86
3-3 Efficacité des constructions antisens pAdIGF-IR(AS) et pAdIGF-IR(AS) 309 mesurée par le système reporter IGF-IR/GFP.....	90
3-4 Construction d'une librairie de clones adénoviraux antisens à IGF-IR.....	94
3-5 Essai d'optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle réplcatif.....	96
3-6 Optimisation d'une méthode de criblage de clones adénovirus antisens à IGF-IR dans un modèle non-réplcatif.....	100
3-7 Criblage de shRNAs par mesure de l'efficacité du processus d'ARN interférence (ARNi) dans un système basé sur l'expression du gène reporter GFP.....	106
3-8 Efficacité du hp2 livré par un vecteur adénoviral.....	112
3-9 Effet du hp2 livré par un vecteur lentiviral sur l'expression d'IGF-IR.....	116
3-10 Analyse de l'efficacité du hp2 et de constructions antisens sélectionnées, livrés par un adénovirus sur l'expression d'IGF-IR endogène.....	121
4-DISCUSSION.....	126
REFERENCES.....	136

Figure 1 Les principales étapes dans le processus de formation des métastases.....	4
Figure 2 Représentation simplifiée de la carte transcriptionnelle de l'Ad2/5 (36kb).....	9
Figure 3 Génôme des Lentivirus et vecteurs lentiviraux.....	16
Figure 4 Mécanisme de l'ARNi résultant en l'inhibition de l'expression du produit d'un gène.....	20
Figure 5 Structure d'IGF-IR.....	30
Figure 6 Transduction du signal induite par le récepteur IGF-IR suite à la liaison du ligand.....	31
Figure 7 Stratégies d'inactivation d'IGF-IR.....	38
Figure 8 Mécanismes des approches utilisant l'acide nucléique pour inhiber l'expression génique.....	43
Figure 9 Représentation schématique du vecteur de transfert adénoviral pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp.....	47
Figure 10 Profil de digestion du vecteur adénoviral de transfert contenant IGF-IR en orientation sens ou antisens.....	50
Figure 11 Vérification de l'orientation de l'antisens IGF-IR 309 dans le vecteur adénoviral de transfert par l'enzyme de restriction XhoI.....	51
Figure 12 Vérification de la présence et de l'orientation de la cassette U6hp2 dans le vecteur pAdCMV5DsRedN1/MLP-PS : profil de digestion par l'enzyme de restriction AscI.....	53
Figure 13 Représentation schématique du plasmide pAd-DsRed2N1-MLP-PS.....	54
Figure 14 Vérification de la présence de la cassette d'expression U6hp2 dans le vecteur lentiviral pRRL.cPPT.CMV5DsRed2-N1-WPRE par les enzymes de restriction SnaBI/HpaI.....	58
Figure 15 Représentation schématique de pRRL.cPPT.U6Hp2.CMV5DsRed.WPRE.....	59
Figure 16 Représentation schématique des étapes réalisées afin de générer des AdVs recombinants par sélection positive avec la protéase PS.....	64
Figure 17 Titration des adénovirus recombinants exprimant les gènes rapporteurs GFPq ou RFP par FACS.....	66
Figure 18 Représentation schématique d'un système d'expression inductible au cumate en configuration répresseur.....	69

Figure 19 Confirmation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR des différents shRNAs.....	77
Figure 20 Exemples d'analyse par cytométrie en flux.....	80
Figure 21 Expression d'IGF-IR dans différentes lignées cellulaires.....	84
Figure 22 Vérification de l'expression d'IGF-IR à partir du plasmide pAdIGF-IR (S).....	85
Figure 23 Validation de la lignée cellulaire 293CymRIGF-IR.....	88
Figure 24 Analyse de l'efficacité de constructions antisens sur l'expression du récepteur IGFI-R.....	92
Figure 25 Génération des clones adénoviraux antisens par digestion bidirectionnelle du gène IGFI-R-AS PL par l'enzyme ExoIII.....	95
Figure 26 Optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle réplcatif.....	98
Figure 27 Évaluation de l'infectivité d'AdCMV5GFPq dans des modèles cellulaires non-réplcatifs.....	102
Figure 28 Optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle non-réplcatif.....	103
Figure 29 Effet de différents shRNAs sur le transgène IGFI-R/GFP.....	108
Figure 30 Validation du clonage du shRNA hp2 dans les vecteurs adénovirus et lentivirus.....	113
Figure 31 Effet du hp2 livré par un vecteur adénoviral sur le transgène IGF-IR.....	114
Figure 32 Effet du hp2 livré par un vecteur lentiviral sur l'expression d'IGF-IR.....	118
Figure 33 Efficacité du hp2 et des constructions antisens sélectionnées sur l'expression d'IGF-IR endogène par infection adénovirale.....	124
Tableau 1 Séquences des différents shRNAs.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdV	Vecteur adénoviral
Ad5	Adénovirus humain de type 5
ARNi	ARN interférence
BSA	Albumine de sérum bovin
CAR	«Coxsackie adenovirus receptor»
CIP	Phosphatase alcaline intestinale de veau
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
cPPT	«Central polypurin tract»
dNTP	Désoxynucléosides
GFP	Protéine verte fluorescente
GFPq	Protéine verte fluorescente modifiée par la compagnie Quantum
Hp	« Hairpin »
HTS	Criblage à haut débit
IGF	« Insulin like growth factor I»
IGF-BP	«Insulin like growth factor binding protein»
IGF-IR	«Insulin-Like Growth Factor Receptor type I»
IRES	Site d'entrée interne des ribosomes
IRS	«Insulin receptor substrate»
ITR	Répétitions terminales inversées
LTR	«Long Terminal Repeats»
LV	Vecteur Lentiviral
MAPK	Protéines kinase activées par des mitogènes
miRNA	«Micro RNA»
MLP	Promoteur majeur tardif
MOI	Multiplicité d'infection
ODN	Oligonucléotide
ORF	Cadre de lecture ouvert
PBS	«Phosphate Buffer Saline»
PCR	«Polymerase Chain Reaction»

PI3K	«phosphatidyl-inositol 3-kinase»
PS	Protéase virale
PTGS	«Post-transcriptional gene silencing»
RCL	Lentivirus compétents pour la réplication
RFP	Protéine rouge fluorescente
RISC	«RNA Induced Silencing Complex»
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SH2	«Sarc homology 2»
SIN	«Self Inactivated»
siRNA	«Small Interfering RNA»
shRNA	«Small hairpin RNA»
TE	tampon Tris-EDTA
ufp	Unité formatrice de plage
VSV-G	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire
WPRES	Elément post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de Woodchuck

1-INTRODUCTION

1-1 Les métastases : un obstacle à la guérison du cancer

Malgré des améliorations importantes au niveau du diagnostic, des techniques chirurgicales ainsi que des différentes thérapies utilisées (radiothérapie et chimiothérapie), la principale raison de décès causé par un cancer est due aux métastases, résistantes aux thérapies conventionnelles, car elles interfèrent avec les fonctions des organes affectés (foie, poumons, os, cerveau)

Les métastases aux poumons et au foie, souvent associées aux phases tardives de certaines tumeurs comme celles du sein ou de la prostate, sont réfractaires à la chimiothérapie et à l'ablation chirurgicale.

Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques régulant les processus de formation des métastases dans ces organes vitaux pourra conduire à l'identification de nouvelles cibles moléculaires et donc au développement de thérapies plus efficaces.

1-1-1 Les principales étapes dans le processus de formation des métastases : pathogenèse

Le processus de formation des métastases est hautement sélectif et consiste en une série d'étapes séquentielles et inter reliées. Afin de produire des lésions significatives, les cellules tumorales doivent compléter toutes les étapes de ce processus (17) (Figure 1), car en effet, toutes les cellules d'une tumeur primaire n'ont pas le même potentiel de dissémination. Ainsi, l'établissement de métastases est l'aboutissement final d'un processus dynamique multiséquentiel impliquant des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Après transformation initiale et croissance des cellules, une vascularisation du foyer primaire a lieu dû à la synthèse et à la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogéniques permettant d'établir un réseau de capillaires. La poursuite du processus implique le détachement de cellules tumorales à partir de leur site primaire, la migration et l'invasion locale des tissus hôtes impliquant l'augmentation de l'expression d'une série d'enzymes (ex : la collagénase). Une fois que les cellules invasives pénètrent dans le système circulatoire, elles doivent résister, entre autres, aux défenses immunitaires de l'hôte et adhérer à l'endothélium vasculaire par des récepteurs spécifiques, pour ensuite infiltrer des organes cibles en utilisant des mécanismes régulateurs de croissance à la fois autocrine et paracrine pour assurer leur prolifération dans le site secondaire et former ainsi des

en utilisant des mécanismes régulateurs de croissance à la fois autocrine et paracrine pour assurer leur prolifération dans le site secondaire et former ainsi des micro-métastases. Ces nouvelles lésions requièrent le développement d'une vascularisation et l'acquisition de mécanismes d'évasion de l'immunité de l'hôte. Elles sont capables à leur tour, d'être la source de nouvelles cellules invasives qui auront la capacité de former de nouveaux foyers appelés foyers tertiaires.

1-1-2 Les déterminants critiques dans la formation des métastases

En 1889, le chirurgien anglais Stephen Paget publiait l'hypothèse de la *graine et du sol* afin d'expliquer le mode de dissémination non aléatoire des cellules invasives. Il concluait ainsi que la distribution des métastases dans les organes n'était pas aléatoire mais que ces dernières se développaient seulement quand la *graine* (certaines cellules tumorales ayant un potentiel à métastaser) et le *sol* (organes permettant un avantage de croissance aux cellules tumorales) sont compatibles. Aujourd'hui, cette hypothèse prend en compte trois principes.

Tout d'abord, les tumeurs sont biologiquement hétérogènes (profils génétiques différents). Deuxièmement, le processus de formation des métastases est sélectif c'est à dire qu'il favorise la survie et la croissance d'une petite sous population cellulaire préexistante dans la tumeur parentale hétérogène. Et enfin, l'apparition de métastases dépend de multiples interactions entre les cellules tumorales (*les graines*) et les mécanismes homéostatiques (*le sol*) (42). La majorité des tumeurs malignes usurpent les mécanismes homéostatiques afin de gagner un avantage de croissance. Les différents organes expriment, au niveau de leur cellules endothéliales différents récepteurs et facteurs de croissance cellulaires influençant le phénotype des métastases qui vont se développer à cet endroit (96;129). Ainsi, le développement d'agents thérapeutiques devrait s'orienter vers le ciblage à la fois des cellules tumorales invasives et des facteurs homéostatiques permettant leur prolifération.

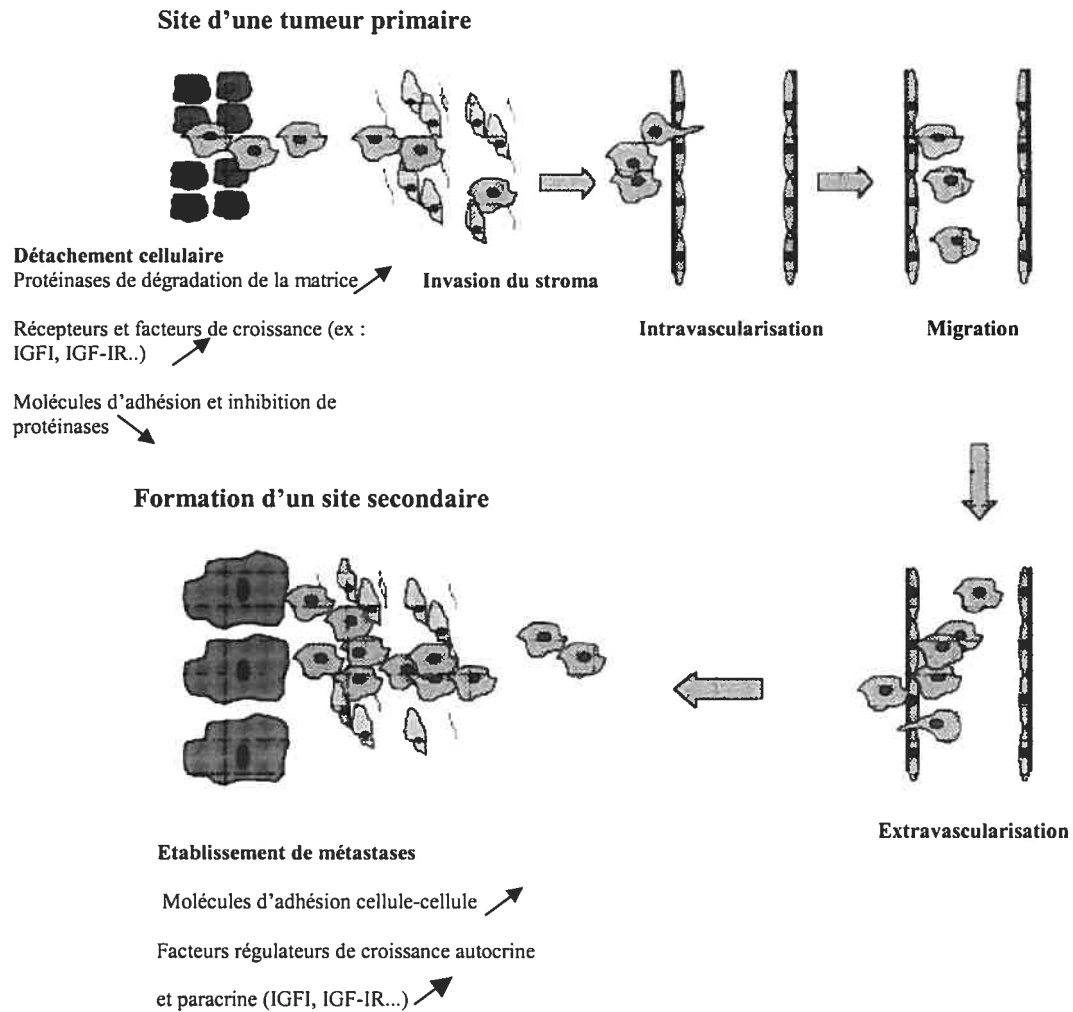


Figure 1 : Les principales étapes dans le processus de formation des métastases. Certains mécanismes moléculaires et médiateurs connus comme étant impliqués ou altérés à chacune des étapes de la cascade sont indiqués.

Reproduit de Brodt P et al (17)

1-2 Les apports de la thérapie génique en oncologie

La génétique, marquée par un essor fulgurant de connaissances et de techniques nouvelles au cours des dernières décennies se trouve aujourd'hui au centre d'enjeux biologiques et médicaux considérables. Les progrès accomplis dans cette discipline bouleversent aussi bien le champ des études du vivant que celui de la pratique clinique.

Cette thérapie, basée sur l'utilisation de particules virales modifiées ayant pour but de livrer une information génétique nouvelle dans les cellules ou le tissu malade cibles, constituerait une alternative aux traitements non sélectifs conventionnels produisant des effets secondaires dans les cellules normales. La thérapie génique est un nouveau concept émergeant dans le traitement des maladies qui utilise du matériel génétique synthétique comme agent pharmacologique. On estime que 145 500 nouveaux cas de cancer et 68 300 décès dus à cette maladie seront enregistrés au Canada en 2004 malgré l'utilisation de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Statistiques Canadiennes sur le Cancer 2004). Ces patients, pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué pourraient bénéficier de cette nouvelle forme de traitement. En janvier 2004, il y a 918 essais cliniques de thérapies géniques enregistrés dans le monde et 66% de ces essais concernent des cancers.

Le dénominateur commun de toutes ces stratégies de thérapie génique du cancer est la reprogrammation de la cellule tumorale afin que cela conduise à un effet thérapeutique. Effet que l'on peut provoquer par l'introduction dans la cellule d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus de l'Herpès Simplex (HSVTK), d'un anti-oncogène (ARN antisens, ribozyme, siRNA), par la surexpression d'un gène suppresseur de tumeur (p53), par l'introduction d'une molécule compétitrice inactive (ciblant un récepteur essentiel pour la croissance) ou encore par l'activation de mécanismes immunitaires de l'hôte.

1-2-1 La livraison du matériel génique dans les cellules cibles

Le développement de systèmes de livraison de l'information génétique précis, efficaces et sécuritaires dans des tissus tumoraux est devenu le centre d'intérêt de la plupart des efforts dans ce domaine et a le potentiel de révolutionner le traitement du cancer traditionnel. Jusqu'à présent, plusieurs stratégies de livraison du gène ont été employées incluant l'injection d'ADN nu, couplé avec des particules lipidiques pour favoriser son entrée dans les cellules (liposomes) ou avec des billes d'or (injection avec un pistolet à air comprimé). Cependant, bien que des essais précliniques aient démontré leur non toxicité, de nombreux problèmes concernant une variabilité d'efficacité de transfection, une expression transitoire du gène, ainsi qu'une séquestration de l'ADN dans les endosomes empêchant ainsi la transcription subséquente dans le noyau, en font des vecteurs d'une efficacité thérapeutique limitée chez les hommes et les animaux. Les vecteurs viraux recombinants, par contre, constituent des agents prometteurs de thérapie génique en raison de leur efficacité de transfert de gène beaucoup plus importante. Cependant leur utilité est aussi limitée par leur manque de spécificité et leur potentiel à modifier la cellule normale aussi bien que la cellule tumorale. Ceci constitue un problème majeur en particulier lorsque des transgènes toxiques sont délivrés. Les limitations majeures de cette technologie pour la livraison de gène dans la tumeur cible peuvent être résumées comme aboutissant à des effets opposés comme une toxicité intolérable ou une trop faible efficacité. Parmi ces vecteurs viraux et malgré les nombreuses limitations qui les caractérisent, les adénovirus et les rétrovirus restent les vecteurs les plus efficaces, les plus étudiés et les plus utilisés dans les protocoles d'essais cliniques sur les humains.

1-2-1-1 Les vecteurs adénoviraux (AdVs)

Les adénovirus (Ad) ont été pour la première fois isolés dans les années 50 comme les agents responsables d'infections mineures comme les rhumes, les conjonctivites ou les gastro-entérites. Il y a plus de 100 sérotypes Ad actuellement identifiés à la fois chez les mammifères et les oiseaux. Le virion Ad est une particule non enveloppée, de forme icosaédrique de 70-100nm de diamètre composée de 252 capsomères et contenant un génome linéaire d'ADN double brin de 25-45kb variable selon le sérotype. Les sérotypes Ad2 et Ad5 sont les plus

étudiés et leur biologie est relativement bien connue. Ils possèdent la capacité d'infecter une grande variété de types cellulaires et ne sont pas dépendants de la réplication des cellules (72). Ces deux sérotypes peuvent être propagés *in vitro* avec de bons rendements. Des titres de l'ordre de 3×10^4 particules infectieuses par cellule peuvent être obtenus (90). Les fibres de l'Ad interagissent avec leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules. Le récepteur CAR («Coxsackie adenovirus receptor»), largement exprimé dans différents tissus, constitue le récepteur primaire pour la transduction par l'Ad (7) (certains sous-groupes d'Ad ne l'utilisent pas). L'entrée de l'Ad dans la cellule est un processus en deux étapes : une interaction initiale entre la fibre de l'Ad avec le CAR (récepteur de haute affinité) ou le CMH-I (Complexe majeur d'histocompatibilité I) (52;63) conduisant à l'attachement du virus à la surface cellulaire suivi d'une internalisation du virus suite à l'interaction de motif RGD de la base penton du virus avec d'autres récepteurs cellulaires (co-récepteurs) comme les intégrines $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$ (87). Suite aux interactions virus cellule, le virus, internalisé par endocytose dans des vésicules de clathrines, perd progressivement les composants de sa capsid, et l'ADN viral nu associé à des protéines est ensuite transporté vers le noyau par les pores nucléaires où le génome viral commence à être transcrit par les enzymes de l'hôte deux heures après le début de l'infection. Le génome viral (Figure 2a) contient des éléments en *cis* à chaque extrémité appelée ITRs (Répétitions terminales inversées) qui sont impliqués dans la réplication de l'ADN et dans l'encapsidation (séquence psi dans l'ITR gauche). L'expression des gènes viraux se fait en deux phases séparées par la réplication du génome viral : une phase dite précoce (durée d'environ 6-8h) où quatre groupes de gènes sont exprimés à partir de cinq promoteurs différents (E1 à E4) et une phase dite tardive (culminant environ 30h post-infection) au cours de laquelle cinq familles de transcrits sont exprimés (L1 à L5) (Figure 2a). Le gène E1A est immédiatement transcrit après l'infection et code pour des protéines contrôlant la transcription des autres gènes précoces et stimule l'entrée en phase S de la cellule hôte. Le gène E1B interagit avec E1A afin d'induire la croissance des cellules (empêche l'apoptose) et favorise l'expression des gènes tardifs. La région E2 contient des gènes directement impliqués dans la réplication de l'ADN viral et pour la stimulation du promoteur majeur des gènes tardifs (MLP). Les gènes de la région E3 sont impliqués dans l'évasion par le virus du système immunitaire en inhibant l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules. Enfin, les six ORFs constituant la région E4 sont impliqués dans le traitement et le transport des ARNm viraux,

dans la régulation de la transcription de la cellule hôte (arrêt) et dans l'apoptose. Bien que les fonctions de quelques uns des produits de ces gènes sont encore inconnues, la plupart d'entre eux sont multifonctionnels et partagent des interactions complexes.

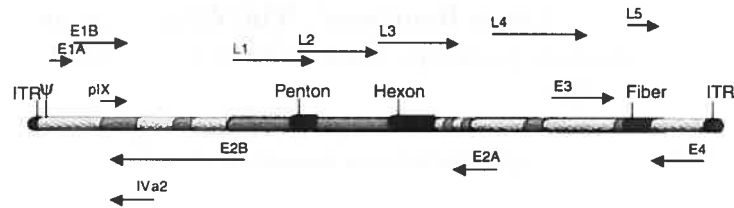
Les gènes tardifs sont sous le contrôle du MLP et sont issus d'un épissage alternatif et de l'utilisation de cinq sites de polyadénylation différents; ils codent essentiellement pour les protéines structurales du virion (106) permettant ainsi l'assemblage, l'encapsidation et la maturation de nouvelles particules virales.

Avec plus de 200 essais cliniques utilisant soit des gènes suppresseurs de tumeur, des cytokines ou des gènes suicides, les AdVs sont les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique du cancer. Plusieurs aspects font que ces vecteurs soient attractifs. Tout d'abord, ils peuvent être produits à des titres élevés, ensuite ils peuvent transduire une grande variété de types cellulaires différents incluant les cellules post-mitotiques, les niveaux d'expression du transgène sont élevés et leur génome reste épisomal n'altérant donc pas de façon permanente la cellule cible (13). Afin d'effectuer le transfert de gènes exogènes dans les cellules de mammifères, les Ads doivent être modifiés afin : d'éliminer leur capacité à se répliquer, d'augmenter leur capacité de clonage, de réduire la réponse immunitaire et ultimement de les cibler vers des récepteurs cellulaires spécifiques.

Trois types de vecteurs peuvent être utilisés (Figure 2b) :

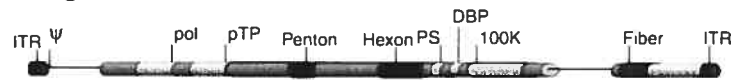
Les AdVs réplicatifs : certaines applications en thérapie génique du cancer ou même en vaccination utilisent ce genre de vecteur pour lesquels une expression élevée et transitoire du transgène est nécessaire et où la toxicité et l'immunogénicité du vecteur constituent un avantage thérapeutique. Ce genre de vecteur comporte des délétions de gènes qui ne sont pas impliqués dans la réplication comme ceux de la région E3. Par exemple pour les vecteurs dits oncolytiques, ceux-ci peuvent exprimer un gène suicide (HSVTK) sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique, et entraîner la mort des cellules infectées et des cellules avoisinantes après un traitement par une pro-drogue (60;104).

a) Génome de l'Adénovirus

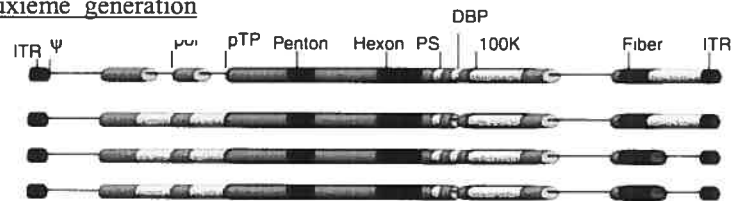


b) Vecteurs Adénovirus

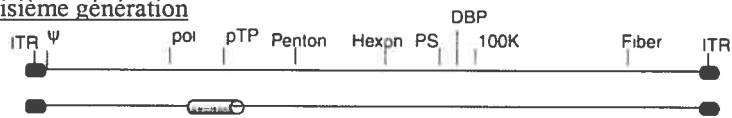
Première génération



Deuxième génération



Troisième génération



Réplicatifs

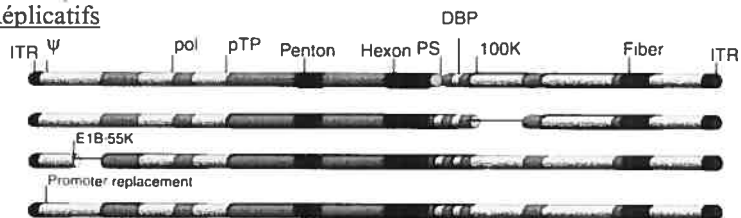


Figure 2 : a) Représentation simplifiée de la carte transcriptionnelle de l'Ad2/5 (36kb).

Les flèches représentent les transcrits viraux, les flèches ombrées représentent les unités transcriptionnelles. E : "early expression"; L : "late expression". Les ITRs et la séquence d'encapsidation ψ sont indiqués. Les portions du génome légèrement ombrées représentent l'ADN enlevé dans de nombreux recombinants AdVs. **b) Schémas des vecteurs adénovirus actuellement utilisés.** Les délétions caractérisant la première, deuxième ou troisième génération et les AdVs réplicatifs sont présentés comme suit :

Première génération : $\Delta E1 \Delta E2$; deuxième génération : $\Delta(E1, E2B, pTP, E3)$, $\Delta(E1, E2A, E3)$, $\Delta(E1 \Delta E3, E4)$, $\Delta(E1, E2A, E3, E4)$; troisième génération : tous les gènes sont délétés excepté pTP.

Reproduit à partir de Bourbeau D et al (13).

Les AdVs non-réplicatifs : la délétion des gènes E1A et E1B caractérise les AdVs dits de première génération. Ces virus étant alors incapables de se répliquer nécessitent d'être produits dans des lignées cellulaires (exemple 293) qui vont compléter la région E1 de l'Ad. Il est bon de souligner que les cellules 293 produisent des titres élevés de virus mais favorisent également la production d'AdVs compétents pour la réplication (RCA)(74). De nouvelles lignées cellulaires notamment les A549 ont été mises au point afin de diminuer les possibilités de recombinaison homologues au niveau de la région E1 (54). La région E3 peut aussi être éliminée car elle est non essentielle à la production virale *in vitro* ce qui va permettre un gain d'espace pour le clonage du transgène sans qu'il y ait besoin de compléter sa fonction. Ces vecteurs dont les régions E1 et E3 ont été enlevées peuvent recevoir un transgène d'une taille allant jusqu'à 8kb. En tenant compte que la capacité maximale d'ADN qui peut être encapsidée est limitée à 105% du génome soit à environ 1.8kb. Ces vecteurs se propagent *in vitro* à des rendements à peu près similaires à ceux des virus sauvages. Dans des animaux immunodéficients, l'expression du transgène peut être stable dans des cellules post-mitotiques pendant des années, cependant chez des animaux immunocompétents une réponse immunitaire entraîne la perte de l'expression du gène thérapeutique une à deux semaines suivant l'infection ou bien l'expression est perdue du fait de la dilution du génome viral au cours des divisions cellulaires. Afin d'éviter l'expression résiduelle de gènes viraux entraînant une réponse immunitaire malgré l'absence de la région E1 (64;131) des AdVs dits de deuxième génération ont été créés. Les régions E2 ou E4 sont enlevées ce qui augmente la capacité de clonage à 11kb et diminue l'antigénicité *in vivo*. Des lignées cellulaires complétant ces délétions ont donc été développées. Les AdVs de deuxième génération n'échappant pas encore complètement à la réponse immunitaire de l'hôte associé au besoin d'introduire des inserts de plus grande taille encore ont amené à la construction d'une troisième génération de vecteurs dans lesquels les gènes viraux ont été complètement éliminés afin de prolonger l'expression du transgène (62). Ces vecteurs appelés "helper-dépendant" ou "gutless" dans lesquels il ne reste plus que les ITRs et la séquence d'encapsidation nécessitent un vecteur auxiliaire (virus de première génération) pour être produits afin de fournir les gènes en *trans* puisqu'il s'avère presque impossible de générer une lignée cellulaire qui complèterait tous les gènes viraux en raison de leur toxicité. Cette dépendance vis à vis d'un vecteur auxiliaire entraîne un problème de contamination avec ce dernier dans les stocks produits et diminuant la production

virale. Ainsi plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer la pureté de ces stocks comme l'utilisation des systèmes Cre-LoxP (95) et Flpe-*frt* (128). L'autre problème est directement lié à la grande capacité de clonage de ces vecteurs. Une taille minimale de 26-38kb étant nécessaire pour la formation de particules virales, l'ADN enlevé doit être remplacé (ADN "stuffer"). Malgré ces problèmes de production, ces vecteurs présentent des avantages indéniables puisque aucun gène viral n'est produit donc la réponse immunitaire est grandement diminuée entraînant par là même une stabilisation de l'expression du transgène sur plus d'un an, une capacité de clonage de 36kb et enfin ces vecteurs possèdent tous les avantages des AdVs de première génération au niveau de leur efficacité de transduction.

Les AdVs réplcatifs non-disséminatifs : les méthodes traditionnelles consistant en la cotransfection dans des cellules types 293 du génome viral et du plasmide de transfert contenant le transgène et une portion homologue au génome viral afin de produire des AdVs recombinants sont inefficaces. La recombinaison est un événement rare et le génome viral incomplètement digéré peuvent conduire à la production de virus non-recombinants. Afin de réduire le temps de production des AdVs un système de coexpression du transgène avec un gène rapporteur tel la GFP a permis de sélectionner seulement les plages d'AdVs recombinants (91). Récemment une nouvelle stratégie a été élaborée, basée sur la sélection positive afin de faciliter la production d'adénovirus recombinants. Des AdVs dont le gène de la protéase a été éliminé ont été développés. Ces vecteurs ne sont capables d'effectuer qu'un seul cycle de réplication dans des lignées cellulaires qui ne complètent pas la délétion. La protéase (PS) est codée par un gène tardif de la région L3. Elle est requise lors de l'internalisation du virus et pour le clivage des protéines structurales du virus. Les virus qui n'ont plus la PS peuvent répliquer leur ADN mais la maturation des protéines virales est impossible ; il n'y a donc pas de progéniture virale produite. Ce type de vecteur (AdV Δ PS) permet l'expression du transgène en grande quantité tout en restant plus sécuritaire qu'un vecteur réplcatif disséminatif.

La stratégie utilisant la sélection positive consiste en l'utilisation d'un plasmide de transfert exprimant le gène de la protéase (PS) afin de compléter la délétion pour ce même gène dans le vecteur viral parental utilisé pour la recombinaison. Ainsi, le virus parental ne pouvant former de particules virales, les particules infectieuses produites sont celles qui ont recombiné avec le plasmide de transfert. Ainsi, après transfection d'un tel plasmide et infection d'un AdV dépourvu de PS dans des cellules permissives, des plages recombinantes pures sont produites

en deux semaines. Cette stratégie permet la construction de bibliothèques présentant une grande diversité car un grand nombre de clones purs sont générés (39).

Les caractéristiques biologiques des AdVs contribuent à leur popularité en tant qu'outil pour des études de génomique fonctionnelles (90) et de thérapie génique. Les efforts aujourd'hui sont tournés vers l'amélioration de leur efficacité et de leur spécificité.

1-2-1-2 Les vecteurs lentiviraux (LVs)

Les scientifiques ont pendant longtemps utilisé les rétrovirus comme le MLV (Moloney murine Leukemia) pour les applications nécessitant un transfert de gène stable (transduction) dans les chromosomes des cellules cibles, un pré requis essentiel pour une expression à long terme du transgène. En plus de cet avantage, les vecteurs rétroviraux ne transduisent pas de gènes viraux évitant ainsi aux cellules transduites d'être détruites par les lymphocytes T cytotoxiques. Ils ont également une capacité de clonage très importante suffisante pour la plupart des applications cliniques. En plus de ces caractéristiques qui sont communes à tous les vecteurs rétroviraux, les vecteurs dérivés des lentivirus (LV) présentent un autre avantage : ils sont capables de transduire des cellules qui ne sont pas en division, un aspect important si l'on veut effectuer de la thérapie génique sur des organes comme le cerveau, les muscles, le foie, les poumons et le système hématopoïétique. Plusieurs laboratoires utilisent différentes sortes de LVs d'origines différentes. La plupart de ces vecteurs sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1 ou 2) mais son utilisation en clinique est encore compromise par le fait que le virus parental est associé à une maladie incurable et encore fatale chez l'humain. Une approche alternative est l'utilisation de vecteurs dérivés de virus de l'immunodéficience chez le singe (SIV), les félins (FIV), les bovins (BIV), les équidés (EIAV) (100).

Les deux extrémités du génome proviral sont constituées par deux LTRs (Long terminal repeats) qui sont structurellement divisées en région U3, R, et U5 contenant des éléments permettant l'activation *in cis* nécessaire pour la transcription. Comme dans tous les rétrovirus les protéines structurales et enzymatiques sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*.

A la différence des rétrovirus murins, HIV et les autres lentivirus possèdent un génome complexe (Figure 3a) qui comprend, en plus des gènes essentiels (*gag*, *pol*, *env*) des gènes régulateurs (*tat* et *rev*) et accessoires (*vpr*, *vif*, *vpu* et *nef*). Les protéines Gag sont traduites à

partir de l'ARN génomique entier en une polyprotéine précurseur clivée par la protéase virale en trois composants principaux : la matrice (MA), la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC) constituant la particule virale mature ; et les peptides mineurs comme p1, p2 et p6 jouant des rôles plus ou moins définis dans la réplication de HIV-1. L'ORF *pol* est traduit en une polyprotéine Gag/Pol résultant d'un glissement de cadre de lecture du ribosome à l'extrémité 3' de *gag*. Les protéines Pol ont des activités enzymatiques variées : reverse transcriptase (RT)/RNaseH, protéase (PRO), et intégrase (IN). L'ORF *env* est exprimé à partir d'un épissage unique d'ARNm. Le produit de *env* est une polyprotéine hautement glycosylée maturée dans le Golgi en deux polypeptides correspondant aux sous unités de surface (SU ou gp120) et transmembranaire TM (gp41). Ces sous-unités sont reliées par des liaisons non-covalentes et forment des oligomères à la surface de HIV-1 et des cellules infectées. Le produit de *env* est le déterminant clé dans la sélection et le ciblage des cellules infectées. Tat et Rev sont traduites à partir d'ARNs multi épissées et sont exprimées au début de la réplication virale. Elles participent dans la régulation de l'expression du génome viral. Tat transactive l'expression du génome en activant l'élongation des transcrits viraux et Rev permet le passage de la phase précoce à la phase tardive de la réplication en activant l'export nucléaire des ARNm viraux non épissés ou ayant été épissés une seule fois (compétitionnant la machinerie d'épissage cellulaire) ce qui permet l'expression de Gag/Pol et des protéines accessoires (101). Bien qu'essentiels pour l'infectivité et la pathogénicité des lentivirus *in vivo*, les protéines accessoires Vif, Vpr et Nef sont largement facultatives pour la culture du virus *in vitro* et pour la conception des vecteurs.

Les premières versions des vecteurs dérivés de HIV-1 consistaient en un génome viral presque entier avec des délétions partielles dans les gènes *gag* et *env* remplacées par des cassettes de gènes rapporteurs. Ces vecteurs étaient utiles pour l'étude de l'infectivité et de la réplication de HIV-1. Par contre, les LVs utilisés pour le transfert de gène ont été développés en utilisant la stratégie du génome partagé. La ségrégation des éléments agissant en *cis* ou en *trans* nécessaires à la production virale offre l'avantage de réduire les risques de génération de lentivirus compétents pour la réplication (RCL) par recombinaison homologe. En plus d'être plus sécuritaire, cette stratégie offre une flexibilité quant au choix du tropisme en raison de l'utilisation possible d'enveloppes hétérologues utilisées pour pseudotyper les vecteurs. L'utilisation de l'enveloppe hétérologue VSV-G (protéine G du virus de la stomatite

vésiculaire) a conduit à la conception de lignées cellulaires qui prendrait avantage de ce système de pseudotypage permettant d'obtenir des titres élevés de virus. Le problème c'est que VSV-G est extrêmement cytopathique en raison de sa capacité à fusionner avec les membranes intracellulaires (70). Les lignées cellulaires ont donc été optimisées afin d'obtenir une expression régulable de VSV-G (57) tout en exprimant les autres composantes essentielles pour la production dans des constructions séparées (61).

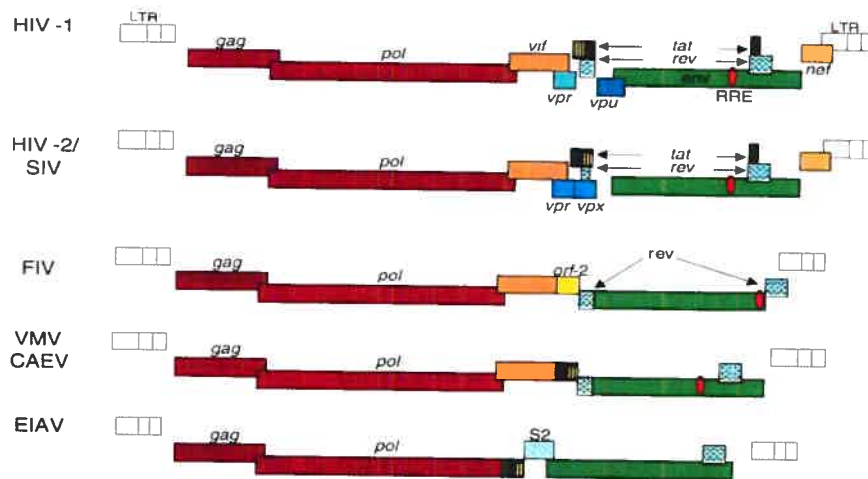
L'unité de production des vecteurs HIV de première génération comprenait toutes les protéines de HIV-1 excepté l'enveloppe. Un premier pas vers l'acceptabilité de ce type de vecteur en clinique fut la démonstration que les propriétés fondamentales de ce système étaient intactes même après la délétion de quatre gènes viraux additionnels codant pour des protéines accessoires constituant des facteurs de virulence cruciaux : Vpr, Vif, Vpu et Nef (143). Des études encore plus récentes indiquent maintenant que le principal transactivateur de HIV, Tat, est également dispensable pour la génération de vecteur entièrement efficaces (37). Ainsi, ce qui peut s'appeler les LVs de troisième génération conservent seulement trois des neuf gènes présents dans le génome du virus parental : *gag*, *pol*, et *rev* (la protéine Rev étant fournie dans une construction séparée). Cela élimine la possibilité qu'un virus sauvage soit reconstitué après recombinaison.

Toujours dans le but d'améliorer la biosécurité au niveau de l'utilisation de ces vecteurs, le système a été amélioré en enlevant les éléments transcriptionnels de HIV dans le vecteur. La région activatrice dans le LTR 3' a été largement éliminée afin de générer des vecteurs "Self-Inactivating Vector"(SIN) (82;142). L'inactivation se produit dans les cellules cibles lorsque au cours de la reverse transcription (RT), la région U3 inactivée est copiée à l'extrémité 5' de l'ADN viral reconstituant ainsi un LTR défectueux. La production de l'ARN viral est ainsi abolie dans les cellules cibles et donc l'émergence de RCLs est minimisée ainsi que la possibilité de transactivation aberrante de gènes cellulaires adjacents au site d'intégration du provirus dans le génome (mutagenèse insertionnelle). De plus, une interférence transcriptionnelle potentielle entre le LTR et le promoteur interne du transgène est empêchée par la conception de vecteurs SINs. Le gène à transférer est exprimé à partir d'un promoteur exogène cellulaire ou viral inséré dans le LV. D'autres versions de ces vecteurs SIN ont rapidement émergé avec des délétions importantes dans le LTR 3' ou des modifications dans les deux LTRs (55;142). Ainsi, l'utilisation des vecteurs SINs permet un ciblage

transcriptionnel de telle sorte que l'expression du transgène est restreinte aux cibles cellulaires dépendamment de la sélectivité du promoteur interne choisi. Des vecteurs de quatrième génération ont été créés afin d'améliorer encore leur possibilités d'utilisation en clinique comme l'ajout dans les vecteurs de transfert des séquences cPPT («Central polypurin tract») et CTS améliorant les titres viraux (117;118). D'autres éléments régulateurs en *cis* augmentant l'expression du transgène de deux à 5 fois ont été ajoutés comme l'élément post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de Woodchuck (WPRE) (Figure 3b) (141).

Les LVs et leurs applications potentielles ont évolué de façon exponentielle depuis quelques années. Leur développement rapide et les avantages indéniables qu'offre ce système de transfert de gène sont prometteurs quant à l'utilisation des LVs dans des applications cliniques. Les LVs ont été en effet utilisés avec succès dans des études précliniques sur des modèles animaux en particulier pour des maladies affectant le système nerveux central et le système hématopoïétique, le cancer (45;114) et le HIV-1 (78). Vpr ayant des effets cytostatiques la possibilité de son utilisation pour des effets anti-cancer est également envisagée. Leur évolution devra spécifiquement se baser sur l'amélioration des vecteurs inductibles, l'utilisation d'enveloppes hétérologues, la production à grande échelle et la validation d'essais permettent la détection de RCLs. Il est possible également que les LVs non-primates soient développés afin d'être peut-être encore plus sécuritaire que ceux dérivés de HIV-1.

a) Génome des lentivirus



b) Vecteurs Lentiviraux et constructions d'encapsidation

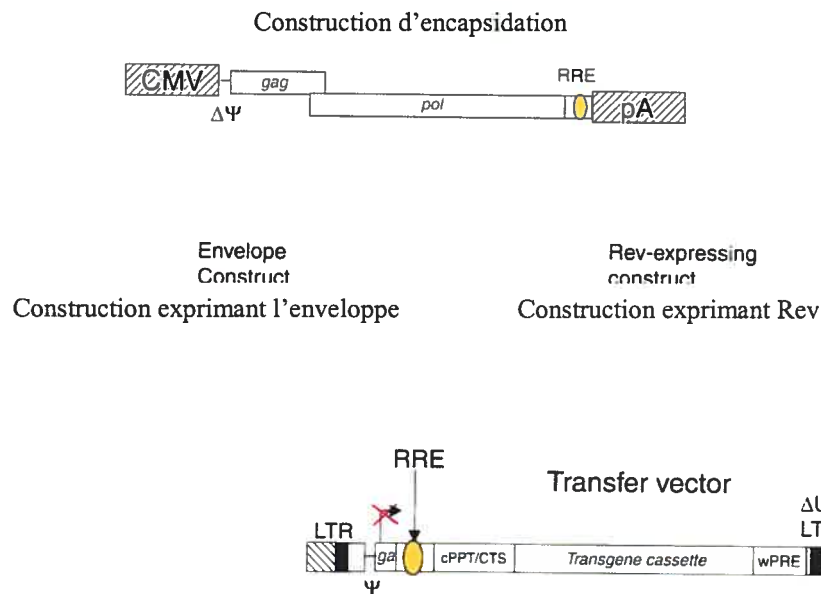


Figure 3 : a) Structure du génome proviral de HIV-1 et d'autres lentivirus. Les positions relatives des ORFs caractérisés et les éléments de réponse à la protéine Rev dans le génome sont indiqués. **b) Schéma montrant les quatre constructions les plus récentes du système de vecteurs lentiviraux.** Tous les ORFs des protéines accessoires et régulatrices ont été enlevés de la construction d'encapsidation. La protéine Rev ainsi que l'enveloppe VSV-G sont exprimées par des constructions séparées. Le vecteur de transfert contient les éléments cPPT/CTS et le WPRE nécessaires pour une efficacité de transduction et une expression du transgène augmentée. Reproduit de Bourbeau D et al (13).

1-2-2 La découverte de l'ARNi révolutionne la génétique traditionnelle

Les approches de la génétique classique permettent d'identifier des mutations dans des gènes, mutations affectant une fonction ou une voie de signalisation particulières. La validation des mutations des candidats identifiés affectant un phénotype est une étape qui prend du temps et qui est difficilement applicable aux systèmes mammifères.

Les stratégies génétiques inverses se basent sur l'inhibition de l'expression d'un gène dont la fonction est suspectée ou inconnue afin de déterminer l'effet sur la fonction ou la voie de signalisation. Ainsi, phénotype et génotype sont directement liés sans avoir besoin d'expériences supplémentaires. Cependant, dans la plupart des cas, ces stratégies sont également longues et chères. Aujourd'hui, alors que les génomes de nombreux organismes modèles ont été en grande partie séquencés, les approches utilisant les acides nucléiques afin de supprimer l'expression d'un gène sont devenues de puissants outils dans l'investigation de la fonction d'un gène. Beaucoup de ces molécules d'acide nucléiques sont maintenant développées comme des agents thérapeutiques qui ciblent les virus et les gènes causant des maladies (35).

Les siRNAs sont une des plus récentes acquisitions qui s'ajoutent au vaste répertoire des molécules d'acides nucléiques servant à supprimer l'expression d'un gène. Ces siRNAs sont en réalité les effecteurs d'une voie de régulation naturelle post-transcriptionnelle des gènes appelée ARN interférence (ARNi). La découverte de cette voie utilisant l'ARNdb afin d'inhiber l'expression génique a complètement révolutionné la génétique réverse. Tous les organismes ont développé des systèmes de protection afin de limiter les effets de l'expression de gènes exogènes ou aberrants. Les virus et les transposons sont des exemples de dangereux parasites dont l'expression et la réplication doit être réprimée afin d'assurer l'intégrité du génome. Grâce aux avancées importantes en génie génétique, on sait que les transgènes sont également reconnus comme des entités génétiques étrangères (12;115). L'intérêt pour ce phénomène a commencé à partir d'expériences sur le nématode *Caenorhabditis elegans* dans lequel l'injection d'ARNdb entraînait la dégradation spécifique des ARNm cytoplasmiques contenant la séquence complémentaire à l'ARNdb utilisé (43;83). La découverte de l'ARNi dans les nématodes a permis d'établir un lien entre un certain nombre de phénomènes semblables observés auparavant aussi bien chez les plantes (co-suppression et plus généralement PTGS,

«Post-transcriptional gene silencing»), chez les champignons ('quelling') mais aussi chez les protozoaires et chez presque tous les eucaryotes supérieurs testés (21;28). Ces expériences confirmèrent que l'ARNdb pouvait être utilisé pour supprimer l'expression des gènes en utilisant une voie ancienne, extrêmement conservée, dont les effecteurs moléculaires sont aujourd'hui très étudiés.

L'ARNi fournit une nouvelle méthode robuste afin d'élucider la fonction des gènes et présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques utilisant les acides nucléiques et permet entre autre d'étudier des espèces qui ne pouvaient pas être amenées à subir des analyses génétiques. Ainsi, cette nouvelle technique de suppression de l'expression du gène («gene silencing») est actuellement la plus utilisée en génomique fonctionnelle.

1-2-2-1 Le mécanisme de l'ARNi

L'ARNdb est adsorbé par les cellules (dans *Caenorhabditis elegans* possiblement par SID-1, un transporteur d'ARN) dans laquelle l'ARN est alors coupé par la Dicer (9) membre de la famille des ribonucléases III (endonucléases spécifiques d'ARNdb) en de petites molécules d'ARNdb appelées siRNAs d'environ 20-25nt avec 2nt sortants en 3' et un phosphate en 5' (Figure 4) (40). Les siRNAs sont alors incorporés au sein d'un complexe protéique, le RISC (RNA induced silencing complex) où ils vont être d'abord déroulés selon un processus dépendant d'ATP par une hélicase. Le siRNA simple brin dans le complexe RISC ainsi activé guide la dégradation spécifique de la séquence d'ARNm cible complémentaire. Le clivage de l'ARNm cible par le RISC se fait au milieu de la région complémentaire, dix nucléotides en amont de l'extrémité 5' du siRNA hybridé (126). La réaction de clivage par le RISC ne nécessiterait pas d'ATP mais serait plus efficace en sa présence (136;137) Le complexe RISC catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphodiester de l'ARN cible donnant des extrémités phosphate en 5' et hydroxyle en 3', réaction nécessitant des ions magnésium.

Le RISC est un complexe multi protéique dont la protéine centrale fait partie des protéines de la famille Argonaute (Ago2 chez la Drosophile, Ago2/EIF2C chez l'humain). Les protéines Ago ont une masse moléculaire d'environ 100kDa et contiennent deux domaines conservés : le domaine PAZ (Piwi-argonaute-zwill) et le domaine PIWI. Le domaine PAZ serait impliqué dans la reconnaissance des deux nucléotides sortant du duplex siRNA afin d'assurer sa

transition dans le complexe RISC en minimisant ainsi l'entrée d'autres ARNs (71;76). D'autres protéines sont associées au RISC humain incluant des hélicases d'ARN, Gemin3 et Gemin4. Chez la Drosophile, les protéines VAG et dFXR font également partie du complexe. Chez la Drosophile, *C.elegans* et les mammifères, le RISC comprend également la protéine TUDOR-SN identifiée récemment (25) qui ne serait probablement pas impliquée dans le clivage de l'ARN cible. La caractérisation des protéines impliquées dans le complexe RISC est très récente et la fonction précise de ces différentes protéines reste encore à élucider.

En outre, les deux brins du duplex d'ARN ne sont pas incorporés de manière égale dans le complexe RISC. Le choix du brin à incorporer dépend à la fois des stabilités absolues et relatives des paires de bases aux extrémités 5' des deux brins du siRNA. Le brin incorporé est toujours celui qui présente une plus faible stabilité thermodynamique en 5' et les siRNAs sont seulement efficaces si ce brin est antisens par rapport à l'ARNm cible (79).

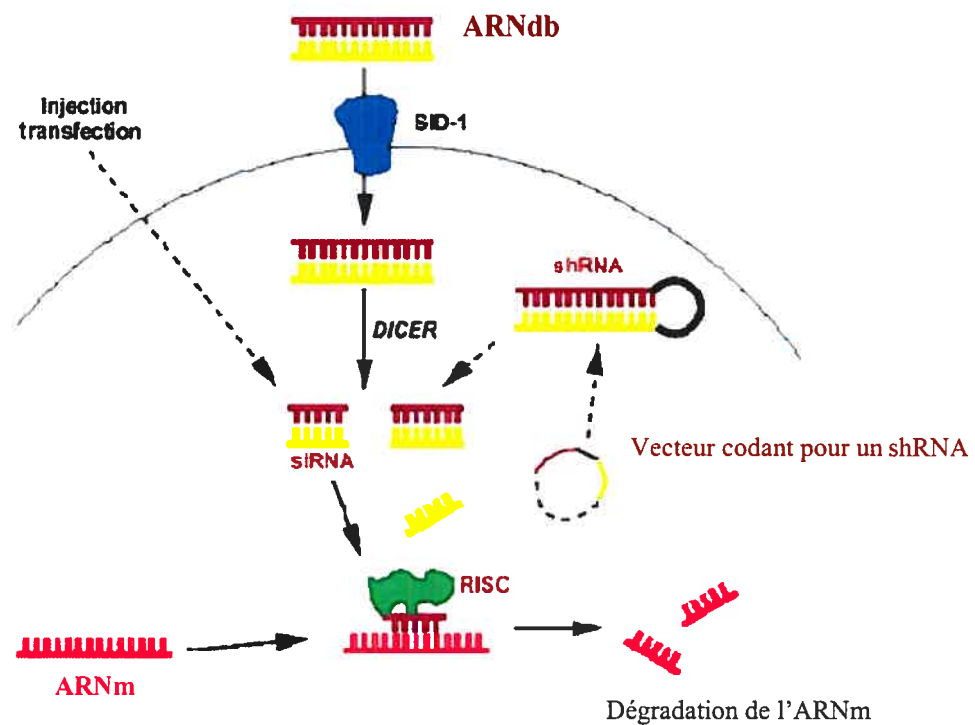


Figure 4 : Mécanisme de l'ARNi résultant en l'inhibition de l'expression du produit d'un gène. Le mécanisme de l'ARNi est initié par l'application (injection ou imprégnation) d'ARNdb ou par transfection des cellules cibles avec des siRNAs ou des vecteurs exprimant des shRNAs. La Dicer coupe l'ARNdb en siRNAs qui sont pris en charge par le complexe RISC où ils vont servir de guides pour le clivage de l'ARNm complémentaire.

Reproduit de Buckingham SD et al (19).

1-2-2-2 Le rôle de l'ARNi dans le contrôle de l'expression génique

Suivant leur origine et leur fonction, il existe trois types de petits ARNs naturels qui ont été décrits : les siRNAs, les rasiRNAs, et les miRNAs (79). Dans la nature, comme nous l'avons mentionné précédemment, les ARNdb peuvent être produits par des virus ou par hybridation de transcrits (par exemple à partir de transposons). De tels ARNdb donnent lieu à des siRNAs ou des rasiRNAs qui vont généralement guider la dégradation d'ARNm et/ou induire des modifications au niveau de la chromatine comme chez *Schizosaccharomyces pombe* ce qui provoque la formation et la stabilisation d'hétéro chromatine (48;130). De plus, des transcrits endogènes qui contiennent des séquences partiellement ou totalement complémentaires peuvent se replier sur elles-mêmes et former des structures d'ARNdb en boucle que l'on appelle pré-miRNAs. Ces pré-miRNAs (70-80nt) sont pris en charge tout d'abord dans le noyau par une ribonucléase de même type que la Dicer, la Drosha pour ensuite rejoindre le cytoplasme où ils vont être clivés par la Dicer afin de former des miRNAs semblables aux siRNAs. L'alignement de séquence entre le miRNA et l'ARNm cible contient des misappariements ce qui provoque une perturbation structurale dans la ARNm aboutissant à une suppression de la traduction (à l'exception des plantes). Des études suggèrent que les siRNAs et les miRNAs soient interchangeable ; seul leur degré de complémentarité avec l'ARNm cible les différencie. Une complémentarité parfaite induit une dégradation alors que plusieurs misappariements conduisent à un arrêt de la traduction. C'est un point particulier à prendre en compte dans les effets non souhaités lors de l'utilisation de siRNAs afin d'inhiber la fonction d'un gène spécifique, puisque fonctionnant comme un miRNA celui-ci pourrait entraîner la dégradation d'autres transcrits (34;138). Plusieurs centaines de miRNAs ont été identifiés chez une grande variété d'espèces et certains d'entre eux sont associés avec la régulation de gènes essentiels impliqués dans le développement (10).

Un autre groupe de molécules qui peut déclencher la voie de l'ARNi est constitué par les shRNAs qui sont des molécules d'ARN simple brin (synthétisée, transcrite ou exprimée *in vitro*) qui forme une structure en épingle dont la base constitue le siRNA (18;19;92;93).

1-2-3 Les siRNA : de nouveaux outils pour la thérapie génique

1-2-3-1 Les siRNAs : des outils pour le criblage génétique

L'ARNdb constitue un outil de choix pour cribler le génome dans de nombreux systèmes modèles comme *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*. Ces criblages ont permis d'identifier des gènes impliqués dans des processus fondamentaux comme la division cellulaire, l'apoptose, la morphologie cellulaire, et des processus physiologiques comme le métabolisme des acides gras (14;58). Grâce à la technologie des siRNAs il est aujourd'hui possible d'effectuer du HTS (criblage à haut débit) dans les cellules de mammifères, dans les ovocytes de *Xenopus*, dans les embryons de poulet, et dans les embryons de rats et de souris (98;121;140). Le criblage direct dans les cellules de mammifères constitue un gain de temps important car il permet d'éviter l'identification de gènes homologues chez les mammifères et donc permet l'identification directe de gènes spécifiques chez l'humain dans différents types cellulaires. Ainsi, comparé aux ODNs ou aux ribozymes, l'ARNi est devenue la méthode de choix pour la génomique fonctionnelle dans les cellules de mammifères et des criblages à grande échelle ont été réalisés en utilisant des siRNAs synthétiques ou des plasmides permettant l'expression de shRNAs (8;94).

Ces criblages ont permis l'identification de gènes impliqués dans l'apoptose, la signalisation, la régulation de la stabilité des protéines et la réponse aux ultraviolets. L'efficacité des criblages a la plus part du temps été limitée en raison de la difficulté à transfecter certains types cellulaires ; ce problème a conduit au développement de nouveaux outils pour améliorer la livraison des siRNAs comme des modifications chimiques ou l'utilisation des vecteurs viraux. Le HTS de cellules de mammifères grâce aux siRNAs constitue une nouvelle plate-forme pour la découverte de nouvelles fonctions de gènes et pour la recherche biomédicale.

1-2-3-2 Les siRNAs : un potentiel thérapeutique

L'ARNi est un outil prometteur pour les analyses fonctionnelles des gènes chez le rat et la souris et a permis la création de souris KO et l'effet des siRNAs est transmis par la lignée germinale (22). Il est possible également de cibler un variant d'épissage et les transcrits de gènes multicopies qui ont des fonctions redondantes et qui peuvent théoriquement être dégradés avec un seul siRNA (49). En ciblant un domaine conservé il est même possible de supprimer l'expression d'une famille de gènes entière (35). L'objectif principal dans l'utilisation de la plupart des petites molécules en thérapie est d'inhiber la fonction de la molécule cible de façon la plus spécifique possible. Faire évoluer l'ARNi d'un outil de génomique fonctionnelle à un outil thérapeutique est évidemment l'issue logique de toutes les études menées sur ce mécanisme. Cependant, il est clair que l'utilisation des siRNA n'échappe pas à plusieurs problèmes déjà rencontrés lors de l'utilisation des stratégies antisens afin d'inhiber la fonction d'un gène. Cela va évidemment du passage des conclusions tirées in vitro à leur application in vivo, ainsi que toutes les conditions de livraison du siRNA dans les tissus ou organes ciblés, de la limitation des effets non-spécifiques incluant les effets immunologiques. Les obstacles sont nombreux mais de très nombreuses études, même si elles restent encore préliminaires sont positives quant à l'utilisation des siRNA en thérapeutique. Un grand nombre de transcrits de gènes impliqués dans diverses maladies ont été ciblés par des siRNAs incluant ceux associés avec certains cancers (18), à des infections virales (66;116;122) des désordres neurologiques (59) et neuromusculaires (19).

1-3 Les facteurs de croissance et leurs récepteurs : des cibles potentielles pour la thérapie anti-tumorale

Le nombre de cellules d'une population cellulaire donnée est déterminé par la balance entre division et mort cellulaire qui n'est autre que le bilan d'un ensemble de signaux positifs et négatifs de la machinerie du cycle cellulaire. Les cellules peuvent mourir par apoptose (induite par des signaux physiologiques et des stimuli noxiogènes incluant le facteur TNF, les virus, les toxines bactériennes, les oxydants, les radiations....) ou par nécrose. Dans une autre mesure, les cellules peuvent arrêter de se diviser afin de se différencier de façon progressive dans des conditions non stressantes afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. La mort par différenciation terminale est en réalité le phénomène majeur grâce auquel l'animal adulte maintient la balance entre division et perte cellulaire. Parmi les nombreux facteurs qui régulent ces processus (génétiques, épigénétiques, environnementaux, mécaniques) les facteurs de croissance (ayant un effet soit stimulateur soit inhibiteur) associés à leurs récepteurs jouent un rôle particulièrement important (2). Ces facteurs de croissance peuvent agir localement par stimulation autocrine ou paracrine ou par des voies endocrines (105).

La liaison d'un de ces facteurs à son récepteur spécifique génère une cascade de signaux intracellulaires qui peuvent éventuellement conduire à une activation transcriptionnelle, à une synthèse de protéines régulatrices, à la réplication du chromosome ou à la mitose. Au cours de cette cascade d'événements, de nombreux points de contrôle à la fois positifs et négatifs contrôlent la progression du cycle cellulaire. Ces molécules ont été divisées en deux principales catégories, les facteurs dits de *compétence* comme PDGF et bFGF permettant aux cellules de rentrer en phase G1 et les facteurs permettant la *progression* comme IGF-1 requis pour la progression du cycle de la phase G1 en phase S pour aboutir à la division cellulaire (105). De nombreux facteurs de croissance signalent leurs effets par des récepteurs tyrosine kinase (RTK) transmettant le message au noyau par un réseau de molécules adaptatrices et de signalisation. L'action des tyrosines kinases consiste en la catalyse du transfert du γ -phosphate de l'ATP vers le groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine d'une protéine cible (84). Cette phosphorylation sert d'interrupteur et de connecteur moléculaire puisqu'elle active ou désactive des enzymes et permet la reconnaissance spécifique du résidu phosphorylé par les effecteurs et/ou

transducteurs du signal. Elle est une des voies majeures de la signalisation cellulaire, qui existe chez l'ensemble du règne eucaryote.

De nombreux RTKs ont été impliqués dans le développement et la progression de maladies néoplasiques (124). L'acquisition du phénotype tumoral induit par ce type de récepteur se traduit par une augmentation de la prolifération, de la suppression de l'apoptose, et de l'activation de processus favorisant l'invasion des cellules tumorales. L'amplification génique, la surexpression et/ou les mutations dans les récepteurs aux facteurs de croissance résultant en une expression constitutive élevée ou en une expression constitutive de la kinase ont été largement documentés dans de nombreuses tumeurs. Le plus souvent, ceci est accompagné par une expression constitutive élevée des ligands respectifs fournissant un mécanisme autocrine pour une croissance autonome. De nombreux oncogènes ont été identifiés comme étant des homologues à des récepteurs aux facteurs de croissance qui sont surexprimés de façon constitutive ou dans la forme active. Étant donné le rôle prépondérant que ces facteurs de croissance et leurs récepteurs ont dans l'induction et la maintenance du phénotype malin, de nombreux efforts visent à développer des stratégies thérapeutiques ciblant les RTKs mêmes, leurs ligands, ou les molécules de signalisation. Deux approches constituent les bases du développement des médicaments anti-récepteurs aux facteurs de croissance : l'une en bloquant le récepteur cible par abolition de la liaison ligand-récepteur et l'autre en inactivant le récepteur tyrosine kinase par de petites molécules inhibitrices (84;124).

1-3-1 Le système IGF : les composantes

Un paradigme idéal afin d'étudier comment les facteurs de croissance régulent avec précision la balance entre reproduction et mort cellulaires est offert par le récepteur IGF-I, un des RTKs impliqués dans l'induction et la maintenance du phénotype transformé/malin (17).

Le système IGF est composé de ligands IGFs (IGF-I et IGF-II ainsi que l'insuline), de récepteurs à la surface cellulaire, le récepteur IGF-I (IGF-IR) et le récepteur IGF-II (IGF-IIR) médiateurs des effets biologiques des IGFs ainsi que des protéines de liaison (IGFBP-1 à IGFBP-6) qui peuvent moduler les activités biologiques des ligands IGFs en augmentant leur demi-vie en contrôlant leur biodisponibilité pour la liaison au récepteur. Ces IGFBPs ne se lient pas à l'insuline et leur action est également régulée par l'action de différentes protéases. En outre, des études ont montré que certaines actions des IGFBPs sont indépendantes des IGFs dans certaines conditions. C'est le cas par exemple, des IGFBP-3 et 5 qui auraient des effets sur la prolifération, la migration ou encore l'apoptose indépendamment de leurs effets sur la signalisation par IGF-IR (69;135).

1-3-2 Le récepteur IGF-I

Le récepteur IGF-I est une tyrosine kinase transmembranaire conservée au cours de l'évolution, ubiquitaire et structurellement similaire au récepteur à l'insuline (IR)(127). Jusqu'à son clonage en 1986, il était considéré comme un récepteur redondant que les cellules utilisaient quand la signalisation par leur récepteur à l'insuline était absente ou défectueuse. Les dernières quinze années d'investigations intensives ont permis de reconnaître IGF-IR comme un récepteur indépendant, avec des fonctions qui à la fois recoupent et diffèrent de celles du IR et jouent des rôles importants dans l'apoptose, le cancer, la différenciation et même la longévité.

1-3-2-1 Structure

IGF-IR a été pour la première fois isolé à partir de placenta humain et présente une forte homologie structurale de 70% avec le récepteur à l'insuline (120). Le récepteur IGF-I humain consiste en un cadre de lecture ouvert de 4101 nucléotides codant pour une protéine de 1367 acides aminés. Il appartient à une famille de récepteurs homologues incluant le récepteur à l'insuline et un récepteur orphelin appelé "Insulin Receptor-related Receptor" (IRR) (105). IGF-IR est synthétisé en une seule chaîne polypeptidique (le pré-propeptide) avec un peptide signal de 30 acides aminés qui est clivée après passage dans le réticulum endoplasmique. Après glycosylation et dimérisation, le propeptide est clivé au niveau d'une séquence tétrabasique arg-lys-arg-arg en sous-unités α et β séparées. Le récepteur est un hétérotétramère constitué de deux chaînes α de 130-135kDa extracellulaires et de 2 chaînes β de 90-95 kDa intracellulaires contenant de nombreux ponts disulfure α - α et α - β (Figure 5). Le domaine de liaison du ligand est localisé sur la sous unité α extra-cellulaire. Approximativement un tiers de la sous-unité β est extra-cellulaire et connectée à la portion intracellulaire par un simple domaine transmembranaire. Les sous-unités β contiennent trois domaines majeurs : le domaine juxtaposé à la membrane, le domaine tyrosine kinase et le C-terminus. Le site catalytique tyrosine kinase est localisé au niveau de la portion cytoplasmique de la sous unité β . La région intracellulaire de la sous unité β contient un site de liaison pour la phosphorylation des substrats au niveau des résidus tyrosine 950, un site de liaison à l'ATP au niveau de la lysine en position 1003, et un domaine tyrosine kinase avec 3 tyrosines critiques aux positions 1131, 1135 et 1136 et plusieurs tyrosines dans le domaine carboxy aux positions 1250, 1251 et 1316, toutes montrées comme étant essentielles pour les fonctions biologiques du récepteur (17). Des analyses par Northern-Blot de l'ARN de IGF-IR ont révélé la présence d'un transcrit majeur de 11kb et des transcrits mineurs de 7kb dans certains tissus humains. Chez le rat adulte le récepteur IGF-IR est fortement exprimé dans le cerveau mais a aussi été trouvé dans de nombreux autres tissus incluant le cœur, les poumons, les reins, les testicules. Des niveaux extrêmement faibles d'ARNm de IGF-IR ont été retrouvés dans le foie sauf lors de régénération du foie ou au cours du développement fœtal.

Les ligands IGF-II ou insuline sont capables de se lier avec ce récepteur mais avec une plus faible affinité qu'IGF-I. Le récepteur IGF-IIR se lie seulement à IGF-II et les deux récepteurs diffèrent complètement tant au niveau de leur structure que de leur fonction

Le récepteur IGF-IIR, contrairement à IGF-IR n'a pas d'activité kinase intrinsèque et n'induirait pas de signalisation à des molécules intracellulaires. Ce récepteur monomérique connu aussi sous le nom d'IGFII/M6P aurait pour fonction, même si celle-ci n'est pas claire, d'inhiber IGF-II. La liaison d'IGF-II sur son récepteur entraînerait son internalisation et sa dégradation, ce qui réduirait l'interaction d'IGF-II avec IGF-IR. Cela résulterait en une diminution de l'activité biologique de IGF-II (135).

1-3-2-2 Transduction du signal : fonction pléiotropique de IGF-IR

Lorsque IGF-I, IGF-II ou l'insuline lient la sous-unité alpha extracellulaire de IGF-IR, un changement conformationnel est induit dans les sous-unités β transmembranaires aboutissant à une autophosphorylation des tyrosines sur la portion intracellulaire de la sous-unité β . Une fois le domaine tyrosine kinase activé, il va y avoir phosphorylation de plusieurs substrats incluant les protéines IRS («Insulin receptor substrate») et Shc. Les protéines IRS (IRS-1 à 4) constituent une famille de protéines adaptatrices, structurellement semblables, pouvant lier IGF-IR à des médiateurs de la transduction du signal régulant la croissance cellulaire.

IRS-1 est la plus étudiée et elle lierait la sous-unité β grâce à un domaine PTB. C'est une protéine de 165-195kDa contenant au moins 20 sites potentiels de phosphorylation et pouvant agir comme une protéine plateforme à laquelle de nombreuses protéines de signalisation en aval vont s'associer comme la PI-3K («phosphatidyl-inositol 3-kinase»), des tyrosines phosphatases contenant des domaines SH2 («Sarc homology 2») (Syp), Fyn, Nck, et des facteurs comme Grb2 par leur domaine SH2. La stimulation de la PI-3K conduit à l'activation de nombreux substrats en aval incluant la protéine kinase B (Akt) capable de phosphoryler BAD et d'atténuer son effet proapoptotique ainsi que celui de la kinase pp70 S6l, de la caspase-9, des facteurs de transcription «forkhead» et la kinase GSK-3 tout en induisant l'expression de protéines antiapoptotiques par exemple Bcl-2 (124). Grb2 est étroitement associé avec le facteur d'échange de nucléotide guanine mSOS liant IGF-IR à la voie des MAPK (Protéines kinase activées par des mitogènes) conduisant à l'activation de facteurs de transcription nucléaires. La

phosphorylation de Shc permet son association avec Grb2 le liant à la voie Ras via le complexe Grb2-mSOS. La phosphorylation préférentielle de Shc ou de IRS-1 dépend du contexte cellulaire et peut orienter la signalisation de IGF-IR vers une prolifération ou une différenciation cellulaires. Les cascades MAPK et PI3K sont les principales cascades de transduction du signal activées par IGF-IR (69). Cependant, dans certains types cellulaires, IGF-IR peut phosphoryler directement les kinases Janus (JAK) 1 et 2 impliquées dans la signalisation par les cytokines ; ces protéines JAK peuvent à leur tour phosphoryler IRS-1. La phosphorylation des JAK peut conduire à la phosphorylation/activation d'activateurs de la transcription comme les protéines STAT en particulier STAT-3 dont l'activation est essentielle pour l'acquisition du pouvoir transformant d'IGF-IR. L'augmentation des niveaux de calcium intracellulaires en réponse à la liaison de IGF-I a orienté les recherches vers une implication possible de la PLC γ par ses produits comme l'IP3 (1, 4, 5 triphosphate inositol) et le DAG (1,2-diacylglycérol). Il est clair que d'autres familles de facteurs de transcription sont impliquées dans la signalisation (Ets, forkhead) ainsi que d'autres substrats directs incluant des proto-oncogènes comme c-Crk II, CrkL ou FAK. Ces molécules pourraient lier le récepteur à la signalisation via les intégrines, le cytosquelette ainsi que à la régulation de la forme cellulaire et de la motilité (17). En outre, la complexité du signal est encore augmentée par l'existence de récepteurs hybrides résultant de la dimérisation d'IGF-IR et d'hémirécepteurs IR. IGF-I ayant une affinité supérieure à l'insuline pour ce type de récepteur hybride, la présence significative de récepteurs hybrides pourrait engendrer une résistance des cellules à l'insuline exprimant ce récepteur. Des analyses de mutagenèse sur IGF-IR ont donc permis la caractérisation de domaines distincts ayant des fonctions différentes. Ainsi, des changements subtils dans la configuration d'IGF-IR peuvent affecter des fonctions biologiques spécifiques du récepteur. L'effet mitogénique, la transformation et la protection contre l'apoptose nécessitent des domaines distincts du récepteur impliquant des voies de signalisation différentes (112) (Figure 6).

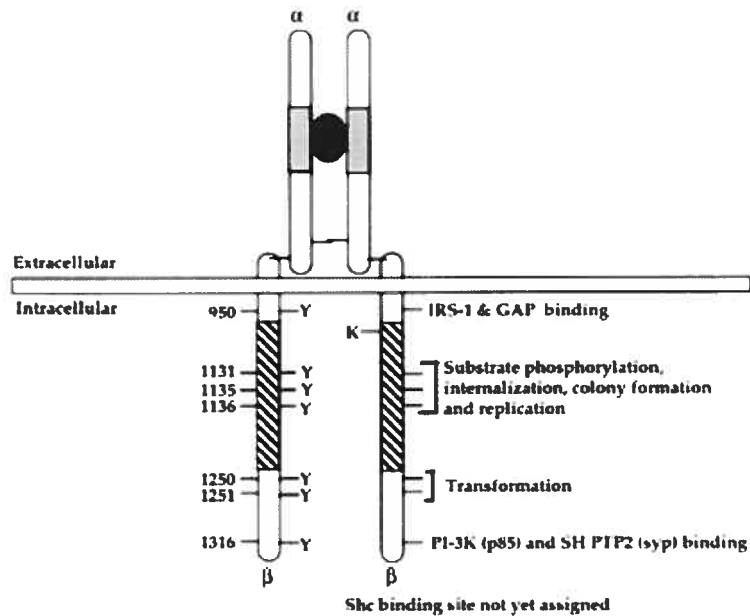


Figure 5 : Structure d'IGF-IR. Les sites de liaison pour la signalisation intracellulaire sont indiqués. Les rôles connus des fonctions du récepteur basés sur des études de mutagenèse sont indiqués. Les parties colorées sur la sous-unité α indiquent les domaines riches en cystéine. Les parties hachurées sur la sous-unité β intracellulaire indiquent les domaines tyrosine kinase.

(GAP : "GTP-ase activating protein")

Reproduit de Brodt, P et al (17).

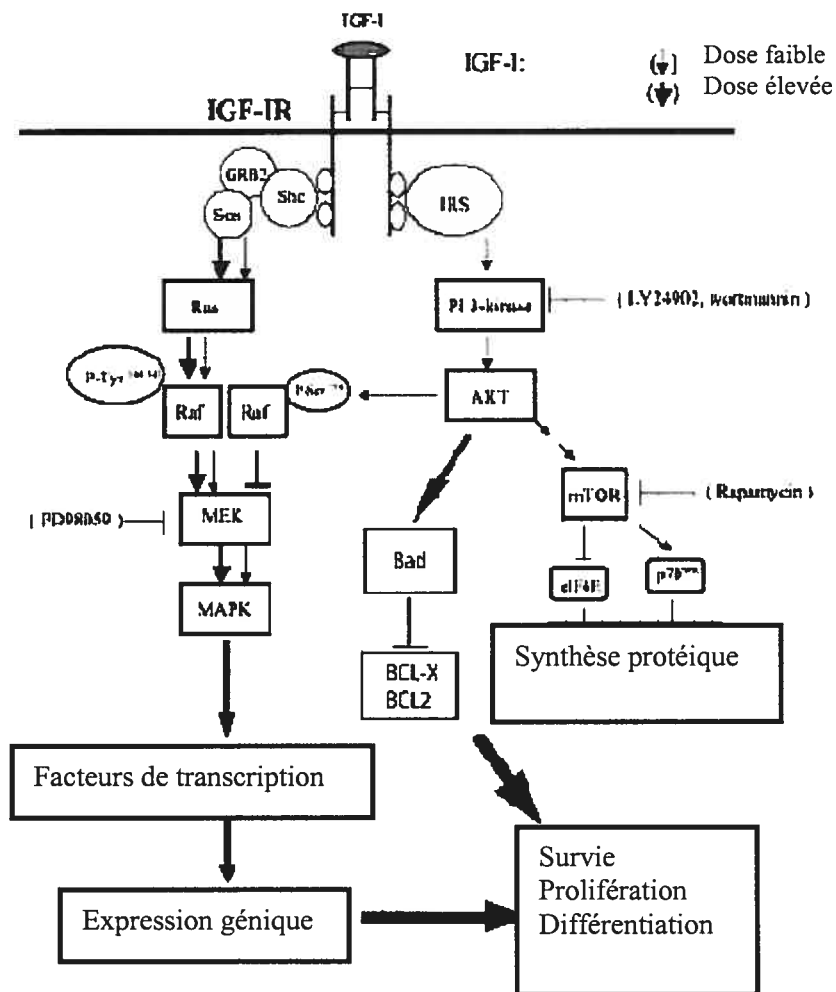


Figure 6 : Transduction du signal induite par le récepteur IGF-IR suite à la liaison du ligand.

La liaison du ligand entraîne une autophosphorylation d'IGF-IR au niveau de multiples résidus tyrosine. La tyrosine kinase intrinsèque phosphoryle alors de multiples substrats incluant IRS1-4 et Shc. Les protéines IRS agissent comme des plates-formes pour l'activation de plusieurs protéines comme la PI-3K (indiquée par ses sous-unités p85 et p110) qui permet l'activation de signaux de survie par l'activation de Akt. Shc et IRS lient le récepteur au complexe Grb-2/mSOS et la cascade Ras/Raf/MAPK conduisant à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

Reproduit de Brodt, P et al (17).

1-3-3 Les aspects pathophysiologiques de l'action d'IGF1R/IGFI : implication dans l'acquisition du phénotype tumoral et métastatique

L'action du récepteur IGF-I peut donc être modulée à différents niveaux aussi bien par les niveaux extra-cellulaires de ligands et la combinaison particulière des récepteurs à la surface cellulaire que par l'abondance relative des cibles en aval du récepteur constituant également un important facteur dans la détermination des effets des IGFs sur une cellule cible donnée.

1-3-3-1 Effet mitogénique d'IGF-IR

IGF-IR joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire (5) et son rôle est essentiel durant l'embryogenèse et le développement. Durant le développement post-natal et la croissance longitudinale, les fonctions des hormones de croissance sont transmises par IGF-I. Les niveaux de IGF-I dans le sérum sont élevés durant l'enfance, déclinant ensuite progressivement après la puberté. Les niveaux d'ARNm de IGF-IR diminuent également considérablement après la puberté mais restent élevés dans certains tissus comme ceux du cerveau ou des reins. Le foie des adultes ont des quantités d'ARNm de IGF-IR excessivement faibles, avec cependant des niveaux qui augmentent durant la régénération du foie.

La prolifération cellulaire dépend à la fois du programme du cycle cellulaire et de la régulation de la taille de la cellule. S'il n'y a pas doublement de la taille cellulaire de la phase G1 à la phase G2, la division cellulaire ne peut avoir lieu. Une sous-expression d'IGF-IR (par des anticorps, des antisens, des peptides analogues) empêche la transition G1-S et donc la prolifération cellulaire à la fois dans les cellules normales et tumorales. Des études avec la lignée de fibroblastes murins Balb/c 3T3 ont montré que même s'il y a induction de la compétence (l'entrée en phase G1 peut se faire par plusieurs facteurs de croissance comme PDGF, FGF, et EGF), la progression en phase S ne peut se faire sans IGF-I. Malgré l'implication importante du récepteur IGF-I dans la croissance cellulaire, son expression n'en est cependant pas une condition absolue mais serait nécessaire pour une croissance optimale (3). En effet, la majorité des souris portant une mutation nulle pour le gène du récepteur IGF-I, meurent à la naissance d'une insuffisance respiratoire et présentent une hypoplasie générale aussi bien au niveau des muscles, de la formation de l'épiderme, des retards dans l'ossification

et au niveau du système nerveux central. De façon globale, le poids des nouveau-nés est diminué de moitié par rapport à des nouveau-nés ne présentant pas la mutation (73). Le récepteur IGF-IR, et de façon plus générale l'axe IGF, contrôle la taille de la cellule et du corps. Il y a donc une partie de la croissance qui est indépendante d'IGF-IR. Cette règle des 50% a été largement confirmée par de nombreux travaux, non seulement en ciblant le récepteur IGF-IR mais aussi ses effecteurs par exemple en ciblant IRS-1, S6K1 ou Akt dont la délétion provoque les mêmes résultats chez les souris et la *Drosophile* que la délétion de IGF-IR (6).

La transformation maligne cependant, est souvent associée à une surexpression et/ou une activation constitutive d'IGF-IR.

1-3-3-2 Les données épidémiologiques

Une augmentation de l'expression de IGF-I et de IGF-IR a été documentée dans de nombreuses tumeurs humaines incluant des tumeurs des poumons, du sein, de la thyroïde, du tractus gastro-intestinal, de la prostate, des glioblastomes, des neuroblastomes et des leucémies (17).

A partir de 1998, les études épidémiologiques se sont multipliées afin de mettre en évidence l'existence d'un lien entre la signalisation par les IGFs et certains cancers. En effet, cette relation aurait été établie après l'observation qu'un taux particulièrement élevé d'IGF-I dans la circulation (30% supérieur à un taux normal) constituerait un facteur de risque potentiel pour les cancers du colon, de la prostate, du sein, des poumons et de la vessie et il semblerait également qu'il y ait une association entre, des hauts niveaux de IGF-I, de faibles niveaux de IGFBP-3 et le risque de développer certains de ces cancers (29;102). Certaines de ces études donnent des résultats variables mais ils sembleraient de façon générale que l'ensemble de ces études suggèrent qu'IGF-I constitue un facteur de risque mais que son utilité en tant que marqueur est limitée en raison de nombreux facteurs. Ces observations ont été confirmées dans des modèles animaux dans lesquels une diminution des niveaux de IGF-I circulant entraînait une diminution significative au niveau du développement de certains cancers, dans la croissance et dans les métastases alors qu'une augmentation de ces niveaux de IGF-I en circulation étaient associés avec une croissance tumorale (29;134).

Ces études épidémiologiques associent un taux élevé d'IGF-I dans le plasma avec un risque élevé de cancer. Ce taux élevé d'IGF-I endocrine peut entraîner une amplification des signaux transmis par IGF-IR.

1-3-3-3 Effet transformant et protection contre l'apoptose

Afin de mettre en évidence le rôle d'IGF-IR dans certains cancers deux aspects seront particulièrement développés : son importance dans l'établissement et la maintenance du phénotype transformé et son rôle dans la survie cellulaire.

L'observation d'un phénotype transformé dans des cellules en culture suite à une surexpression du récepteur et/ou une hyperactivation de sa signalisation a suggéré l'importance d'IGF-IR dans la formation des tumeurs. Des expériences plus tardives avec des fibroblastes d'embryons de souris (MEF) déficients pour le récepteur (IGF-IR^{-/-}) ont montré que des agents oncogéniques cellulaires ou viraux (Ras activé, l'antigène T de SV40, la protéine E5 du virus du papillome bovin) étaient incapables d'induire une transformation de ces cellules en l'absence de IGF-IR alors que ces agents étaient transformants lorsque le récepteur était réexprimé (110;111). De nombreuses études *in vitro* avec différentes lignées cellulaires tumorales ont mis en évidence que IGF-IR était impliqué dans le développement de nombreuses maladies néoplasiques car l'inhibition de l'expression du récepteur par différentes stratégies antisens entraînait une diminution du nombre de récepteurs, diminution associée à une réversion du phénotype transformé. Dans certaines maladies, par exemple dans le cancer du sein, IGF-IR est surexprimé et hyperphosphorylé par rapport à son état dans des cellules normales épithéliales mammaires (47). L'hyperactivation de IGF-IR résulterait d'une stimulation autocrine ou paracrine du fait que de nombreuses tumeurs sont capables de produire les ligands du récepteur (124). Ainsi, les études réalisées les vingt dernières années ont montré que les cellules transformées expriment le récepteur à de plus hauts niveaux que des cellules normales. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels l'expression du gène de IGF-IR est augmentée dans les tumeurs restent non identifiés et aucune mutation génique n'a été identifiée dans ces tumeurs (3).

Le pouvoir transformant d'IGF-IR dépend de sa capacité à assurer la survie des cellules transformées. De nombreuses études ayant pour but de cibler le récepteur dans les cellules tumorales (*in vitro* et *in vivo*) ont abouti à l'apoptose des cellules tumorales et à une importante, voire totale suppression de leur croissance (6). Des cellules exprimant des antisens au récepteur rentrent en apoptose quand elles sont transplantées dans des souris ou des rats ou quand elles sont placées dans des conditions indépendantes de l'ancrage. C'est ainsi qu'il a été observé que l'inhibition de l'expression du récepteur *in vitro* avait un effet partiel et parfois presque nul sur la croissance des cellules en monocouche. Par contre, l'inhibition devient très importante voire létale si ces mêmes cellules sont testées en conditions indépendantes de l'ancrage (formation de colonies en agar mou). Cela souligne donc un rôle plus important et même crucial de IGF-IR dans la maintenance du phénotype transformé alors que son rôle est partiel dans la croissance des cellules (3).

Le ligand IGF-I a été aussi classifié comme étant un facteur de survie car il est capable de bloquer l'apoptose en réponse à de nombreux inducteurs et ce, dans une grande variété de types cellulaires incluant fibroblastes, cellules hématopoïétiques et cellules épithéliales (5).

1-3-3-4 Rôle de IGF-IR dans les métastases

De nombreuses études mettent en évidence le rôle des facteurs de croissance dans des phénotypes associés avec des métastases à différentes étapes comme l'invasion et la dissémination des cellules tumorales et l'angiogenèse. IGF-IR a été identifié comme un régulateur positif du phénotype invasif/métastatique et son ligand IGF-I comme un facteur de croissance agissant de façon paracrine notamment dans le foie. La surexpression d'IGF-IR et de IGF-II dans des modèles de culture cellulaires augmente la production d'enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. La vascularisation de la tumeur contribue également à son potentiel métastatique et l'activation d'IGF-IR augmenterait l'angiogenèse. Il existe également une coopération entre les intégrines et les cadhérines et le système IGF qui contribuerait à l'établissement du phénotype métastatique. Les intégrines permettent l'interaction entre la cellule et la matrice extra-cellulaire et elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la migration, la survie et la croissance. Comme elles n'ont pas d'activité kinase intrinsèque, elles dépendent de leur association avec d'autres

protéines pour transmettre leurs signaux. IRS-1, le substrat majeur de IGF-IR serait un des connecteurs impliqués dans l'association des deux voies (47). On pourra également prendre l'exemple de la lignée H-59, qui sera utilisée dans notre étude. Cette lignée dépend de la surexpression d'IGF-IR pour se métastaser préférentiellement dans le foie. Si l'expression de IGF-IR est diminuée dans les H-59, celles-ci perdent leur potentiel mitogénique en réponse au IGF-I, expriment des niveaux de métalloprotéinase dégradant la matrice extra-cellulaire (MMP-1,2) réduit, deviennent non-invasives et ne sont plus capables de former des métastases dans le foie après inoculation dans l'animal (5;17;107;139).

1-4 Les stratégies d'inhibition de l'expression d'IGF-IR

L'ensemble de ces recherches a permis d'orienter les efforts vers la recherche de l'utilité du système IGF en tant que marqueur de diagnostic et en tant que cible thérapeutique dans la thérapie du cancer. En effet IGF-IR répond à plusieurs critères ce qui en fait une cible pharmaceutique attractive. Il est impliqué dans la transformation cellulaire et est capable d'influencer plusieurs aspects du phénotype malin, IGF-IR et ses ligands sont en quantités abondantes et donc peuvent être mesurés facilement dans des échantillons cliniques et de plus, des études *in vitro* ont permis d'identifier des paramètres critiques pour son induction. Étant donné qu'il est situé en amont et qu'il intervient dans des voies de signalisation variées, son ciblage thérapeutique s'avère plus prometteur qu'un intermédiaire dans la signalisation même si dans certaines tumeurs certains de ses effecteurs moléculaires sont mutés (27;99). De plus, l'inhibition de IGF-IR sensibilise les cellules tumorales à d'autres agents anticancérigènes (81) et augmente leur sensibilité à des drogues cytotoxiques et aux irradiations.

De nombreux laboratoires se sont lancés dans la conception de molécules anti-IGF-IR démontrant ainsi que l'inhibition de la liaison IGF-IR/ligand, de l'expression de IGF-IR ou de la signalisation par IGF-I permet d'obtenir des effets antitumoraux importants (124) (Figure 7). Seules les approches antisens ciblant l'ARNm seront développées (Figure 7a).

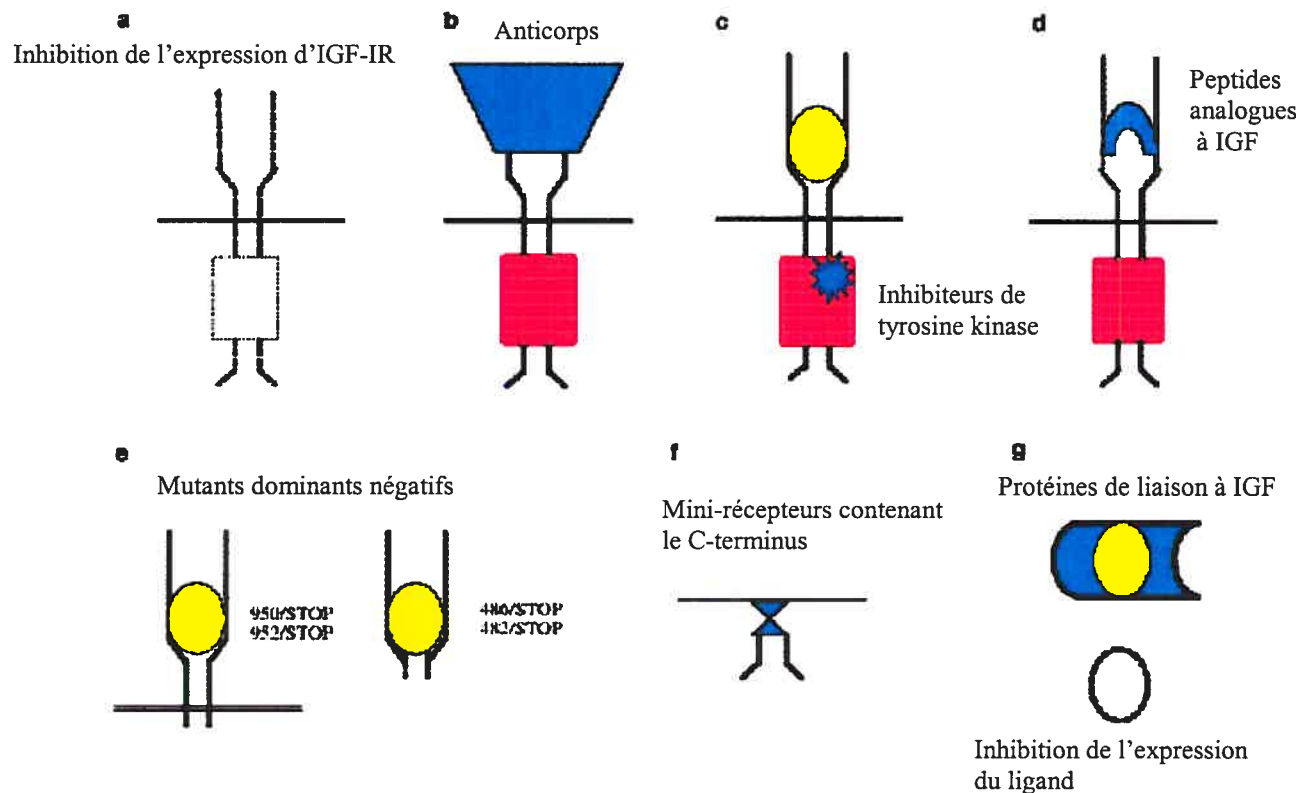


Figure 7 : Stratégies d'inactivation d'IGF-IR a) Réduction ou élimination de l'expression protéique d'IGF-IR par blocage de la transcription (avec une molécule triple hélice) ou de la traduction (avec des ODNs antisens, des constructions d'ARN antisens et des siRNAs). b) La fonction d'IGF-IR peut-être bloquée en utilisant des anticorps qui empêchent la liaison du ligand et qui induisent la dégradation du récepteur. c) L'activité tyrosine kinase de IGF-IR peut être abolie avec des petites molécules inhibitrices. d) Des peptides mimétiques de IGF-I peuvent compétitionner avec les ligands naturels. Leur liaison à IGF-IR inactive le récepteur. e) Des mutants IGF-IR qui n'ont plus les sous-unités β peuvent agir comme des récepteurs dominants- négatifs. f) L'expression du C-terminal de IGF-IR myristillée, un domaine ayant une activité proapoptotique peut inhiber l'expression de signaux de survie. g) La disponibilité des ligands peut être réduite avec un excès de protéines de liaison, ou par une inhibition de l'expression du ligand au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

Reproduit de Surmacz E. et al (124).

1-4-1 Les stratégies ciblant l'ARN

De nombreux types de molécules différentes dont le mode d'action est basé sur l'inhibition spécifique de l'expression d'IGF-IR par complémentarité avec son ARNm, ont été développées dans l'espoir de créer de nouveaux agents thérapeutiques. Les trois principaux types de molécules ainsi développées sont les ODNs (oligonucléotides) et les ARNs antisens, les ribozymes et les siRNAs (Figure 4 et 8).

1-4-1-1 ODNs et ARN antisens

Des agents antisens peuvent être générés par l'expression dans les cellules d'ARN antisens ou d'ODNs synthétisés chimiquement. L'action de ces molécules est conduite par l'hybridation de l'ARN antisens sur l'ARNm cible et des ODNs sur les pré-ARNm ou les ARNm cibles (Figure 7a).

La production protéique est ainsi inhibée directement en bloquant la traduction ou par dégradation directe de l'ARNm par l'activation de la RNase H dégradant spécifiquement le brin d'ARN dans l'hétéroduplex ODN-ARN. Si les ODNs sont modifiés chimiquement de façon à contourner l'action de la RNaseH, ils peuvent alors inhiber la traduction de l'ARNm en créant un encombrement stérique empêchant ainsi l'épissage des pré-ARNm (35).

La plupart des ODNs anti-IGF-IR contiennent des séquences complémentaires au site d'initiation de la traduction d'IGF-IR car il est connu que cette région de l'ARNm ne présente pas de structures secondaires majeures afin de faciliter l'initiation de la traduction constituant ainsi un site accessible à l'hybridation des ODNs et aux ARNs antisens.

Il existe de nombreuses études décrivant une inhibition de l'expression d'IGF-IR dans les cellules tumorales grâce à ces deux approches. Parmi elles, certaines ont montré que des ODNs anti-IGF-IR, à des concentrations de quelques nanomolaires, diminuent son expression et réduisent la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose dans de nombreuses lignées tumorales humaines et de rongeurs *in vitro* (11). De plus, un traitement avec ces ODNs est capable d'induire une apoptose massive et une régression tumorale dans des modèles animaux. Cependant, cette réduction de l'expression de IGF-IR est souvent incomplète même avec de

fortes concentrations d'ODNs (100-500nM), possiblement en raison de leur faible association avec la séquence cible.

Différents vecteurs exprimant un fragment d'ADNc antisens à IGF-IR ont été utilisés afin d'inhiber l'expression du récepteur. Ces vecteurs (plasmides ou virus) produisent des ARNs antisens qui s'hybrident par complémentarité de séquence à l'ARNm du récepteur, bloquant ainsi sa synthèse. Par exemple, un ARN antisens dirigé contre les premières 309 bases de l'ARNm d'IGF-IR, livré aux cellules par transfection (108) ou infection par un rétrovirus (107) est capable de réduire l'expression d'IGF-IR, la prolifération et la survie dépendante de IGF-I dans de nombreux modèles cellulaires humains ou de rongeurs. L'expression de cet antisens est capable d'inhiber de façon efficace la tumorigénicité de cellules cultivées comme des explants dans des animaux par induction d'une apoptose massive et d'inhiber les métastases de cellules de cancer de poumon murin (H-59). De plus, ces approches augmentent également la sensibilité des cellules cancéreuses (sarcomes et cancers de la vessie et de la prostate) à des drogues cytotoxiques (123).

1-4-1-2 Les ribozymes

Les ribozymes se lient à l'ARN par complémentarité de base et permettent la dégradation de l'ARNm cible en catalysant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester (36) (Figure 8b). Il y a plusieurs classes de ribozymes avec le ribozyme en forme de tête de marteau qui est le plus utilisé et qui, comme son nom l'indique forme une structure secondaire caractéristique lorsqu'il s'hybride à sa cible d'ARNm. Les résidus catalytiques importants dans le ribozyme sont encadrés par des séquences complémentaires encadrant le site de clivage sur l'ARNm. Ils sont suffisamment courts pour être chimiquement synthétisés ou être transcrits par des vecteurs. Des ribozymes contre IGF-IR sont capables de réduire la migration cellulaire endothéliale *in vitro* et la néovascularisation de la rétine *in vivo* dans un modèle murin (113).

1-4-1-3 Les siRNA

Les siRNAs, molécules effectrices de la voie de l'ARNi (Figure 4) comme il a été décrit précédemment ont été utilisés contre le récepteur murin dans des cellules de mélanome humain et murin, de cancer du sein, d'ovaires et de la prostate humains. Dans cette étude, une inhibition de plus de 80% de l'expression de IGF-IR a été obtenue bloquant ainsi la réponse aux IGFs et augmentant la radiosensibilité des tumeurs (11).

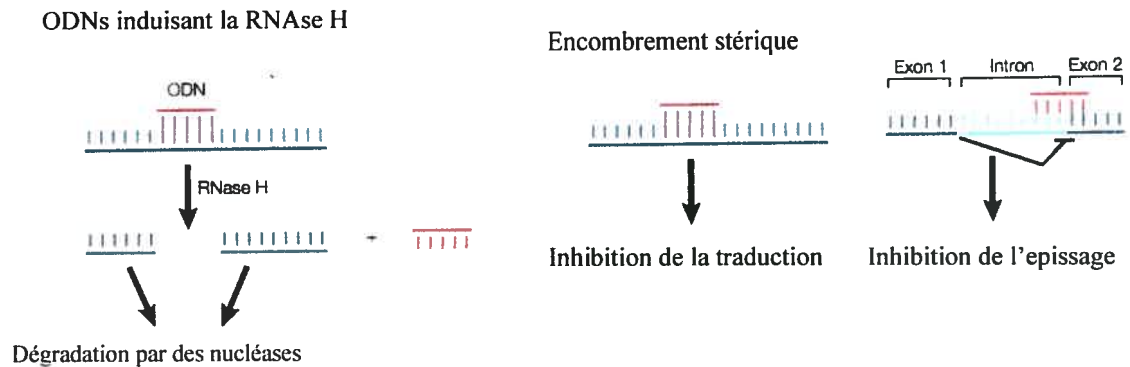
1-4-2 Efficacité comparée des siRNA et des ARNantisens : des problèmes communs

L'utilisation de vecteurs d'expression de molécules d'ARNs antisens est une des méthodes qui a été le plus utilisé durant la dernière décennie (132). Cependant, toutes ces molécules n'ont pas forcément un effet antisens. Il y a eu beaucoup d'études sur les facteurs déterminant l'activité fonctionnelle des antisens (109) mais le problème récurrent dans les différentes stratégies utilisées est celui de la spécificité de la molécule dite thérapeutique avec sa cible. En plus des risques d'homologies avec les gènes cellulaires, dans le cas d'IGF-IR, le problème réside essentiellement dans sa forte homologie avec le récepteur à l'insuline et part la présence de récepteurs hybrides dans certaines cellules. De nombreuses études relatent des problèmes de réactivité croisée avec le IR. Cependant, les avancées récentes au niveau de la modélisation moléculaire ont permis l'identification de nouvelles cibles dans l'ARNm de IGF-IR tout en permettant d'éviter les régions d'homologie avec le IR mais il est vrai qu'une prédiction précise de la structure secondaire de l'ARNm est limitée par sa longueur (144). Il a donc été démontré, par une étude associant criblage à haut débit et modélisation moléculaire que la structure secondaire de l'ARNm est un facteur essentiel à prendre en compte afin de déterminer les sites accessibles à l'hybridation, ceux-ci étant directement liés à l'efficacité des molécules utilisées (11). La spécificité étant aussi directement liée au choix de la séquence de l'ARN antisens ou du shRNA/siRNA, des algorithmes permettant une sélection rationnelle de ces molécules ont été développés afin d'augmenter la probabilité de choisir des molécules efficaces (33;68;103). Néanmoins, même si de nombreuses études permettent aujourd'hui de prédire en partie l'efficacité d'un ARN antisens ou d'un siRNA/shRNA, il n'en reste pas moins que la méthode

empirique reste la plus utilisée. En contre partie, les cellules eucaryotes ont également développé des mécanismes de surveillance de l'ARNm (50;77) ainsi que des réponses non spécifiques à l'ARNdb entraînant l'activation de la voie des interférons (pour une longueur de l'ARNdb supérieure à 30nt) observée également dans des études récentes avec des siRNAs (15;119).

En outre, en ce qui concerne les siRNA/shRNA, le degré d'homologie minimum requis pour s'hybrider avec sa cible et entraîner sa dégradation n'est pas clairement identifié mais il a été rapporté que l'hybridation de seulement 11 nucléotides consécutifs peut affecter les niveaux d'ARNs de transcrits non ciblés (56). Cependant, il est quand même important de noter que l'utilisation des siRNAs est suffisamment spécifique pour permettre le ciblage de transcrits d'allèles qui peuvent ne différer que par un seul nucléotide à la seule condition que le misappariement soit situé au milieu du siRNA (80).

a) Composés antisens



b) Ribozymes

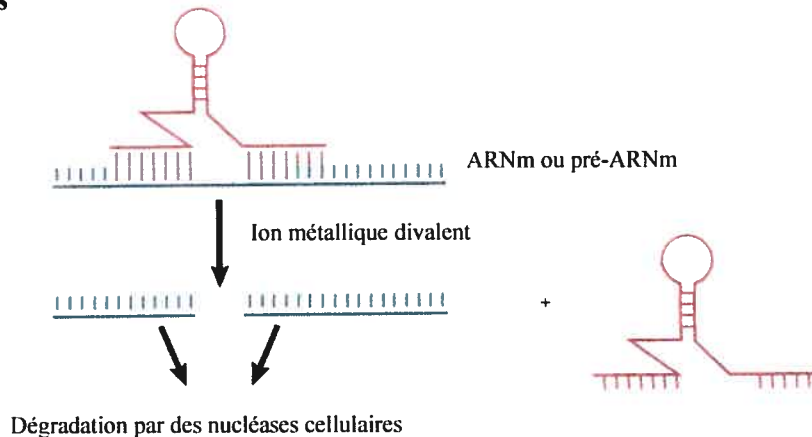


Figure 8 : Mécanismes des approches utilisant l'acide nucléique pour inhiber l'expression génique a) Les composés antisens. Représentation des deux mécanismes par lesquels les composés antisens altèrent spécifiquement l'expression d'un gène. Une fois introduits dans la cellule, les ODNs antisens peuvent s'hybrider à l'ARNm ou au pré-ARNm. Le brin d'ARN dans le duplex ADN/ARN est dégradé par la RNase H. Certaines de ces molécules complexées à l'ARN ne sont pas reconnues par la RNase H et peuvent alors être utilisées pour inhiber la traduction des ARNm ou altérer l'épissage des pré-ARNm. **b) Les ribozymes.** Représentation générale du mécanisme d'inhibition spécifique d'un gène par un ribozyme. Les ribozymes peuvent être produits dans la cellule par transcription ou peuvent être directement introduits dans la cellule par manipulation expérimentale. Pour le ribozyme à tête de marteau deux bras sont utilisés afin de diriger le centre catalytique afin de diriger l'hydrolyse de la liaison phosphodiester de l'ARNm.

Reproduit de Dorsett Y et al (35)

1-5 Hypothèse et objectif de recherche

Un niveau élevé d'IGF-IR ayant été identifié comme un marqueur de la progression tumorale, l'altération de son expression devrait permettre d'abolir ce phénotype invasif.

L'objectif global de cette étude est de développer une stratégie de thérapie génique pour lutter contre les métastases, stratégie basée sur le ciblage d'IGF-IR identifié comme un déterminant critique dans l'acquisition du phénotype malin.

Le projet comportait trois volets :

Premièrement, la construction d'une librairie adénovirale nous a permis de présélectionner des fragments antisens à IGF-IR dont l'efficacité relative a été vérifiée.

Deuxièmement, plusieurs shRNAs ont été construits et leur efficacité confirmée en utilisant un système où le transcrit d'IGF-IR était exprimé de façon transitoire en configuration dicistronique avec un gène rapporteur.

Et enfin, les molécules d'ARN antisens ou de shRNAs les plus efficaces sélectionnées par ces deux méthodes ont été clonées dans des vecteurs adénoviraux et lentiviraux afin de comparer leur efficacité sur une lignée cellulaire surexprimant le transgène IGF-IR et sur le modèle murin H-59 dont l'acquisition du phénotype malin est dépendante de la surexpression d'IGF-IR.

2-MATERIEL ET METHODES

2-1 Construction de plasmides

2-1-1 Construction des plasmides pAdCMV5-P2DC-IGF-IR(S)-GFPq/MLP-PS, pAdCMV5-P2DC-IGF-IR(AS)-GFPq/MLP-PS et pAdCMV5-P2DC-IGF-IR(AS)309-GFPq/MLP-PS

L'ADN codant pour les séquences du gène de IGF-IR d'origine murine pleine longueur (4500pb) ainsi que le fragment antisens IGF-IR de 309pb d'origine humaine dont l'efficacité a été démontrée *in vitro* et *in vivo* chez la souris (107) ont été gracieusement fournis par le Dr Pnina Brodt (Hôpital Royal Victoria, Montréal).

Le plasmide pIGF-IR (7500pb) a d'abord été digéré par les enzymes SpeI et SacII afin de récupérer le fragment d'ADN codant pour IGF-IR. Une quantité de 5µg de vecteur a été digérée par l'enzyme SpeI (2U/µg d'ADN) et le milieu réactionnel a été supplémenté du tampon NEBuffer #2 [50mM NaCl, 10mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) et de 0.1µg/µL de BSA. Le volume a été ajusté à 50uL et la réaction incubée à 37°C pendant 2h. Après vérification de la linéarisation par SpeI sur gel d'agarose 1% et purification sur colonne Quiagen (Quiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne) de l'ADN linéarisé, l'enzyme SacII (2U/µg) fut rajoutée avec le tampon NEBuffer #4. La réaction fut incubée 2h à 37°C. La bande de 4500pb correspondant à IGF-IR fut isolée sur gel et purifiée sur colonne (Quiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne). Les extrémités du fragment IGF-IR furent rendues franches par un traitement à la T4 DNA polymérase avec le tampon de l'enzyme T4 polymérase [50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] additionné de 50ug/mL de BSA et d'un mélange de dNTPs à une concentration finale de 100nM chacun. Le volume final a été complété à 60µl et 6U de polymérase T4 ont été ajoutées. La réaction a alors été incubée à 12°C pendant 20 minutes avant d'être arrêtée par dénaturation de l'enzyme à 75°C pendant 10 minutes. L'ADN fut ensuite purifié sur colonne Qiagen selon le protocole du fabricant.

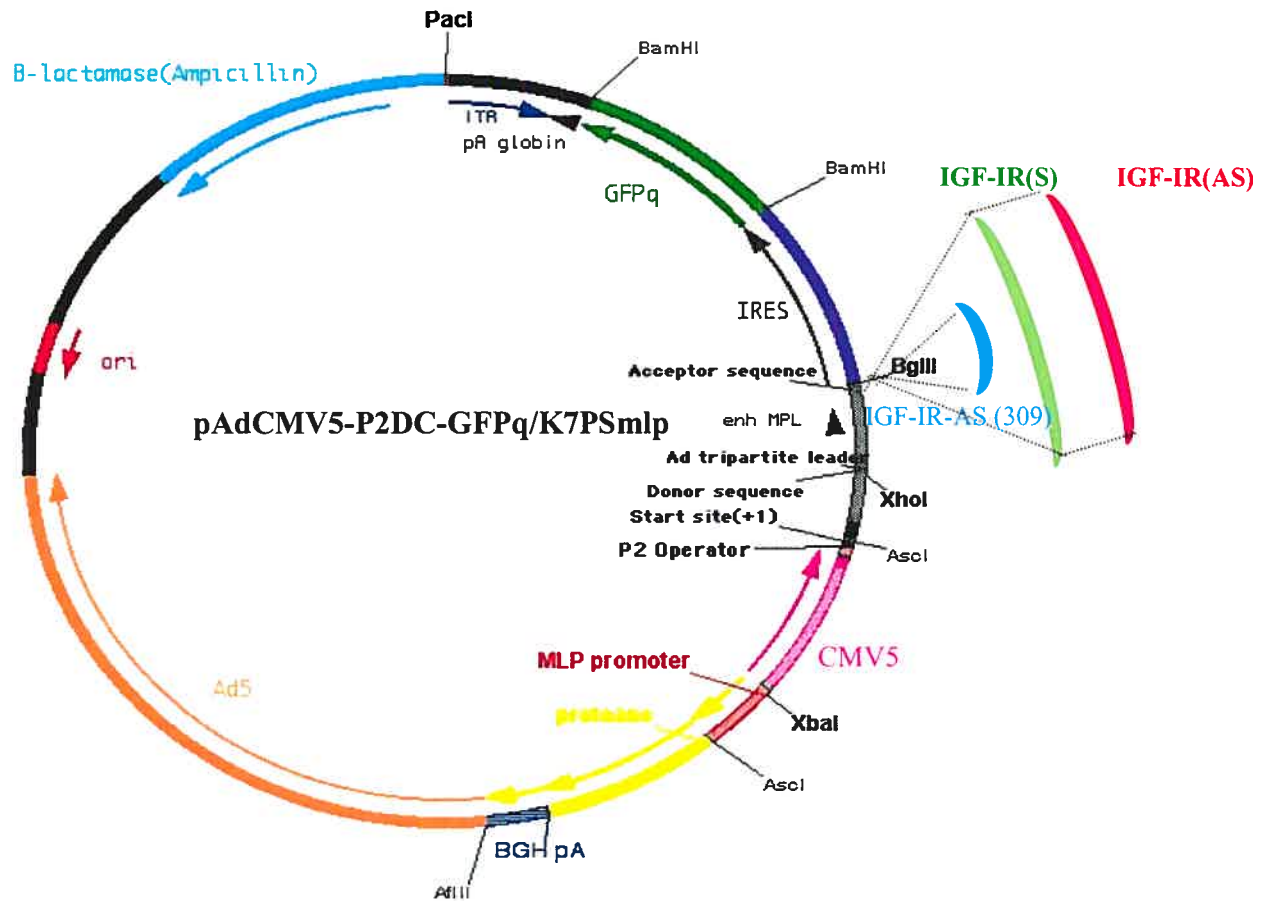


Figure 9 : Représentation schématique du vecteur de transfert adénoviral pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp

Ce vecteur de transfert contient une partie du génome Ad5 permettant la recombinaison homologue avec (9.4 à 15.5 m.u : maps units) afin de générer des adénovirus recombinants, une cassette d'expression contenant le gène de la protéase PS sous le contrôle du promoteur MLP (Major Late Promoter), une cassette d'expression contenant le gène rapporteur GFPq en configuration dicistronique avec IGF-IR(S), IGF-IR(AS) ou IGF-IRAS(309) sous le contrôle du promoteur fort CMV5 inductible au cumate. ITR: Répétitions terminales inversées. β -Lactamase : gène bactérien de résistance à l'ampicilline. Ori : origine de répllication d'*E.coli*. pA Globin: séquences de polyadénylation de la β -globine, pA BGH : signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine.

Le plasmide pIGF-IR-IRES-EGFP (6937pb) fut digéré par BamHI et BglII (2U/ug d'ADN) simultanément dans le tampon NEBuffer BamHI [150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol) (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) additionné de 0.1µg/µL de BSA pendant environ 3 heures à 37 C. Le fragment de 309pb obtenu fut séparé sur gel d'agarose 1% et purifié sur colonne PCR du kit Qiagen (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne).

Le vecteur pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp (Figure 9) a été linéarisé au niveau du site de clonage BglII. Une quantité de 5µg de vecteur a été digérée par l'enzyme BglII (2U/µg d'ADN) et le milieu réactionnel a été supplémenté de tampon NEBuffer #2 [50mM NaCl, 10mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA). Le volume a été ajusté à 50µL et la réaction fut incubée à 37°C pendant 2h. Après vérification de la linéarisation par BglII sur gel d'agarose 1%, une partie de vecteur a été utilisée afin de rendre les extrémités franches par un traitement à la T4 DNA polymérase pour le clonage de l'insert IGF-IR pleine longueur dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Le vecteur linéarisé avec et sans extrémités franches a ensuite été déphosphorylé avec 0.5 unité de phosphatase alcaline par µg de vecteur dans du tampon NEBuffer #3 [100Mm NaCl, 50Mm Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1Mm dithiothreitol] pendant une heure à 37°C. Le vecteur fut ensuite purifié sur colonne Quiagen selon le protocole du fabricant. Environ 150ng de l'insert IGF-IR pleine longueur et 100ng de vecteur ont été ligués en présence de 400U de T4 ADN ligase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA dans du tampon ligase [50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10mM dithioethreitol, 1mM ATP, 25ug/mL BSA). Environ 100ng de vecteur aux extrémités cohésives et 10ng d'insert IGF-IR 309 ont été ligués dans les mêmes conditions. Les ratios molaires utilisés sont 1 molécule de vecteur pour 3 molécules d'inserts. Les réactions furent incubées 16 heures à 12°C. La transformation a été effectuée en incubant 50uL de bactéries compétentes *E.coli* DH5α avec le produit de ligation pendant 30 minutes sur glace. Un choc thermique a ensuite été effectué en incubant 45 secondes les bactéries à 42°C suivi d'une incubation sur glace pendant 2 minutes. Un volume de 200uL de milieu Luria-Bertani (LB) a alors été rajouté et les bactéries ont été incubées à 37°C sous agitation pendant 30 minutes. Les bactéries sont finalement étalées sur des pétris de LB agar additionnés de 100ug/mL d'ampicilline et incubées à 37°C jusqu'au lendemain. Les

bactéries des différentes colonies ont ensuite été mises en culture dans 5mL de milieu LB contenant 100ug/mL d'ampicilline. L'ADN plasmidique de ces cultures a été extrait avec le kit QIAprep (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne). La présence de l'insert IGF-IR pleine longueur ainsi que son orientation dans le vecteur ont été vérifiées par digestion à l'aide de l'enzyme AflIII (Figure 10). Le profil de digestion comportait trois fragments permettant de distinguer l'orientation sens et antisens d'IGF-IR dans ce vecteur.

Orientation sens : 1103pb, 4551pb et 7746pb

Orientation antisens : 1103pb, 2451pb et 9846 pb.

Afin de vérifier la présence et l'orientation de l'insert IGF-IR de 309pb, les minis préparations d'ADN furent digérées par XhoI résultant à l'observation de deux bandes de 8550pb et de 600pb (orientation sens de l'insert) ou de 8800pb et de 350pb (orientation antisens de l'insert) (Figure 11).

Une confirmation de l'orientation de chacun des inserts a été réalisée par séquençage en utilisant le mélange dRhodamine (dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Une quantité de 0.5ug de plasmide a été utilisée pour la réaction de séquençage avec 4uL de mélange dRhodamine et 2pmoles d'amorces s'hybridant en amont du site BglIII utilisé pour le clonage dans la séquence accepteur (voir carte). La réaction a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystem, Foster city, CA). Le cycle de séquençage utilisé était le suivant :

96 °C /10sec	} 25 cycles
50 °C /5sec	
60°C / 4min	
4°C jusqu'à purification	

Le produit de la réaction PCR fut purifié sur colonne Centri-Sep (Centri-Sep Spin columns, Princeton Separations, Adelphia, N.J) en utilisant un gel de filtration Sephadex (Sephadex 50, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). L'étape de purification fut conduite selon le protocole du fabricant. L'échantillon fut ensuite déshydraté dans un lyophilisateur pendant environ 20 minutes et envoyé au service de séquence de l'Institut de Recherche en Biotechnologie.

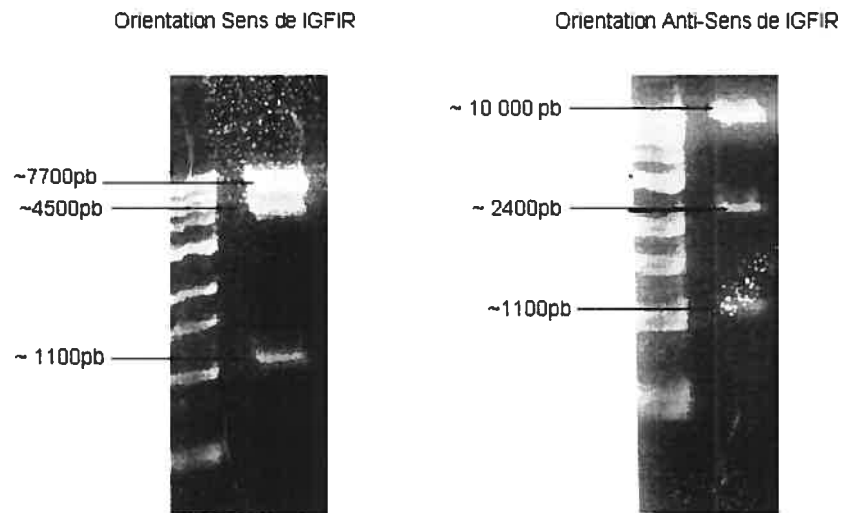


Figure 10 Profil de digestion du vecteur adénoviral de transfert contenant IGF-IR en orientation sens ou antisens. La digestion enzymatique par AflII a permis de distinguer l'orientation sens de l'insert IGF-IR (1103pb, 4551pb et 7746pb) de l'orientation antisens (1103pb, 2451pb et 9846 pb) dans le vecteur adénoviral de transfert.

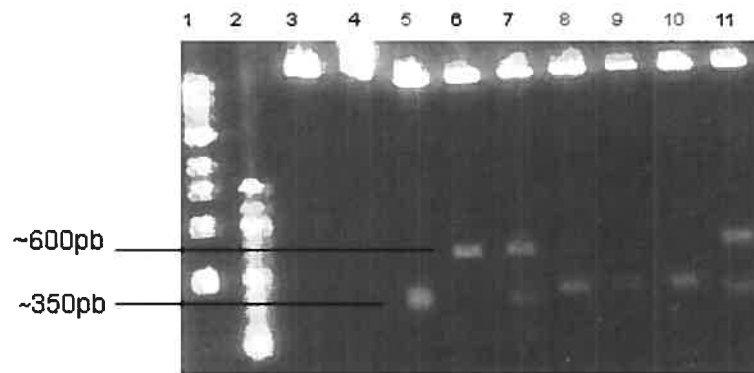


Figure 11 Vérification de l'orientation de l'antisens IGF-IR 309 dans le vecteur adénoviral de transfert par l'enzyme de restriction XhoI.

Lignes 1 et 2 : échelle d'ADN 1kb et 100pb ; Lignes 3 à 11 : minis préparation d'ADN digérées par XhoI ; Lignes 5, 8, 9 et 10. Minis préparations d'ADN ayant IGF-IR 309 en orientation antisens.

2-1-2 Construction du plasmide pAdCMV5DsRed/U6hp2/MLP-PS

La cassette d'expression U6Hp2 a été préalablement obtenue par digestion du plasmide pPCR-U6hp2 (dont la construction est détaillée ultérieurement) par EcoRI (2U/μg d'ADN) et le milieu réactionnel a été supplémenté de tampon NEBuffer #2 [50mM NaCl, 10mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA). Le volume a été ajusté à 50μL et la réaction a été incubée à 37°C. L'insert fut séparé sur gel d'agarose 1% et purifié sur colonne Qiagen selon le protocole du fabricant. Le plasmide pAdCMV5DsRed2N1-MLP-PS fut linéarisé par XbaI (Figure 12) et purifié sur colonne (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne). Les extrémités ont été rendues franches par un traitement à la T4 DNA polymérase dans des conditions décrites précédemment. Après quantification sur gel d'agarose 1% de l'insert et du vecteur, environ 100ng de vecteur et 10ng d'insert ont été ligués (selon un ratio molaire 1:3 vecteur: insert) en présence de 400U de T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) dans du tampon ligase. La réaction fut incubée 16 heures à 12 C et 5uL de la ligation furent utilisés afin de transformer les bactéries *E.coli* DH5α. Afin de vérifier la présence de l'insert les minis préparations d'ADN furent digérées par l'enzyme de restriction AscI. Le profil de digestion correspondant à la présence de l'insert donnait deux bandes, l'une de 7373pb et l'autre de 1258pb, sans l'insert 7373pb et 908pb (Figure 13).

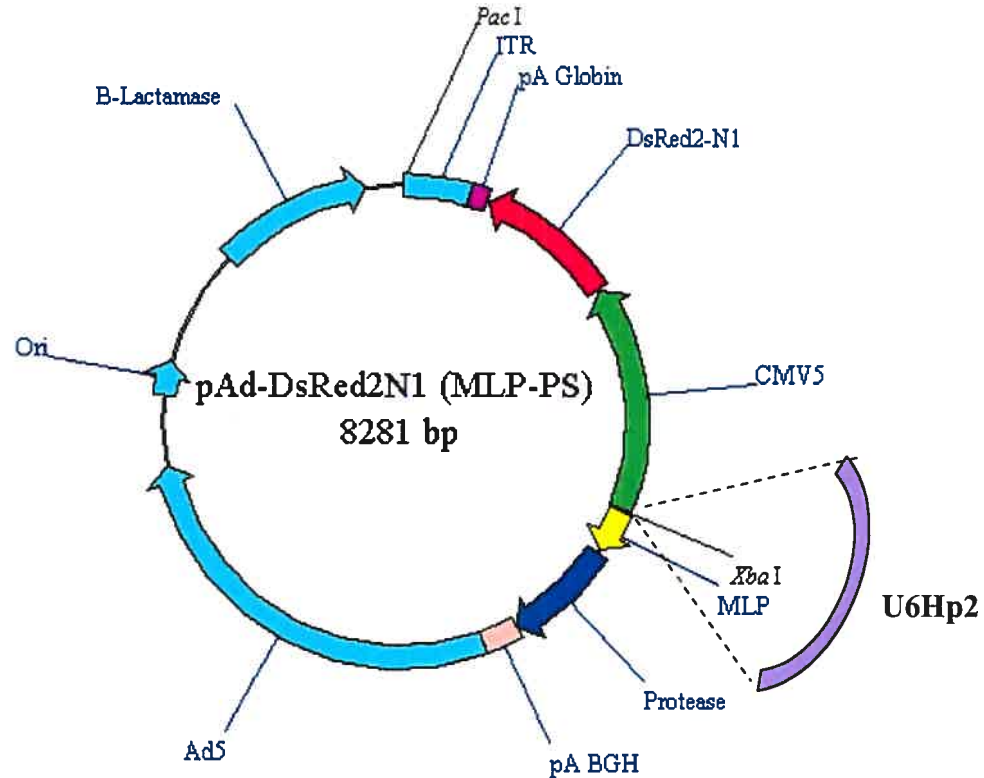


Figure 12 : Représentation schématique du plasmide pAd-DsRed2N1-MLP-PS.

Ce vecteur de transfert contient une partie du génome Ad5 permettant la recombinaison homologue avec (9.4 à 15.5 m.u : maps units) afin de générer des adénovirus recombinants, une cassette d'expression contenant le gène de la protéase PS sous le contrôle du promoteur MLP (Major Late Promoter), une cassette d'expression contenant le gène rapporteur DsRed2N1 sous le contrôle du promoteur fort CMV5 et une cassette d'expression du shRNA hp2 sous le contrôle du promoteur U6 humain. ITR : Répétitions terminales inversées. β - Lactamase : gène bactérien de résistance à l'ampicilline. Ori : origine de réplication de *E.coli*. pA Globin : séquences de polyadénylation de la β -globine, pA BGH: signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine.

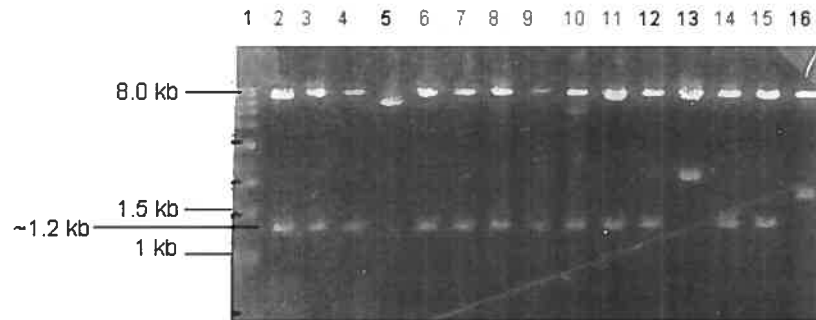


Figure 13 Vérification de la présence et de l'orientation de la cassette U6hp2 dans le vecteur pAdCMV5DsRedN1/MLP-PS: profil de digestion par l'enzyme de restriction *AscI*. Ligne 1: échelle d'ADN 1kb ; Lignes 2 à 16: clones digérés par *AscI*. Lignes numérotées en rouge: clones positifs pour la présence de l'insert (deux bandes 7373pb et l'autre de 1258pb).

2-1-3 Construction du plasmide pRRL.cPPT/U6Hp2/CMV5DsRed2-N1-WPRE

La stratégie utilisée afin de construire ce plasmide consistait à remplacer la GFPq du plasmide pRRL.cPPT.CMV5-GFPq.WPRE (Figure 14) par le gène codant pour la DsRed obtenue à partir du plasmide pDsRed2-N1 (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA). pDsRed2-N1 a donc été digéré successivement par les enzymes de restriction NotI/BamHI et pRRL.cPPT.CMV5-GFPq.WPRE par les enzymes SalI/BamHI. Les sites BamHI étant compatibles, les extrémités obtenues à l'issue de la digestion de NotI/SalI ont été rendues franches afin de permettre un clonage unidirectionnel.

pDsRed2-N1 (4700 pb) a d'abord été digéré par NotI. Une quantité de 5µg de plasmide a été digérée par l'enzyme NotI (2U/ µg d'ADN) dans du tampon NEBuffer #3 [50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) dans un volume total de 50µl. La digestion a été incubée 2h à 37°C. L'ADN a ensuite été purifié sur colonne (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne). La linéarisation du plasmide a été vérifiée sur gel d'agarose 1% et l'extrémité digérée a été rendue franche par un traitement à la T4 DNA polymerase. L'ADN a ensuite été digéré par BamHI rajoutée au volume de réaction (2U/µg) ainsi que le tampon NEB spécifique à BamHI [150mM NaCl, 10mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA), ainsi que de la BSA (0.1µg/µL). Le volume de la réaction a été incubé 2h à 37°C. Le volume total a été chargé directement sur un gel d'agarose 1% et le fragment correspondant à l'ADN de la DsRed2-N1 (bande de 750pb) a été extrait du gel et purifié sur colonne Qiagen.

pRRL.cPPT.CMV5-GFPq.WPRE a d'abord été digéré par SalI. Une quantité de 6µg de plasmide a été digérée par l'enzyme SalI (2U/ µg d'ADN) dans du tampon NEB spécifique à SalI [150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) additionné de 0.1µg/µL de BSA dans un volume total de 50µl. La digestion a été incubée 2h à 37°C. L'ADN a ensuite été purifié sur colonne Qiagen selon le protocole du fabricant. La linéarisation du plasmide a été vérifiée sur gel d'agarose 1% et l'extrémité digérée a été rendue franche par un traitement à la T4 DNA polymerase. Après purification sur colonne, l'ADN a ensuite été digéré par BamHI dans les mêmes conditions que précédemment. Le volume total a été chargé directement sur un gel d'agarose 1% et deux

fragments, l'un de 7.5kb et l'autre de 0.75kb ont été obtenus. Le fragment correspondant à l'ADN du vecteur la (bande 7.5kb) a été purifiée grâce au kit Quiagen selon le protocole du fabricant.

Les deux fragments d'ADN correspondant au vecteur pRRL.cPPT.CMV5--WPRE et à l'insert DsRed2-N1 ont été préalablement quantifiés sur gel d'agarose 1% avant d'effectuer une ligation avec 50ng de vecteur et 15ng d'insert. La réaction de ligation a été effectuée avec la QuickLigase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) dans du tampon 2X spécifique [132mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 2mM dithiothreitol, 2mM ATP, 15% Polyethylene Glycol (PEG 6000)]. La réaction a été incubée 5min à température ambiante. Des bactéries E.coli DH5α ont été transformées avec le produit de ligation. La présence de insert DsRed2-N1 dans le vecteur a été vérifiée par digestion avec les enzymes BamHI/EcoRI. Deux fragments sont observés s'il y a présence de l'insert, l'un à 6.5kb et l'autre à 1.5kb. Afin de vérifier la validité de la construction et la fonctionnalité de la DsRed2-N1 placée sous le contrôle du promoteur CMV5, deux clones ont été transfectés dans des cellules 293A. 24h après transfection, les cellules ont été observées au microscope à fluorescence. L'observation d'une fluorescence émettant dans le rouge a permis de valider la construction du plasmide pRRL.cPPT.CMV5DsRed2-N1 - .WPRE.

La cassette d'expression U6Hp2 a été préalablement obtenue par digestion du plasmide pPCR 2.1 par EcoRI (fragment de 350pb) et les extrémités ont été rendue franches comme il a été déjà détaillé précédemment. Le vecteur pRRL.cPPT.CMV5DsRed2-N1 -.WPRE a été linéarisé par l'enzyme de restriction SpeI afin d'insérer la cassette U6Hp2 entre le CMV5 et le cPPT (Figure 11). Une quantité de 5μg de vecteur a été digérée par l'enzyme SpeI (2U/μg d'ADN) et le milieu réactionnel a été supplémenté du tampon NEBuffer #2 [50mM NaCl, 10mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) avec 0.1μg/μL de BSA. Le volume a été ajusté à 50μL et la réaction a été incubée à 37°C pendant 2h. Après vérification de la linéarisation par SpeI sur gel d'agarose 1%, les extrémités du vecteur ont été rendues franches avec la T4 DNA polymérase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA). Après purification sur colonne Qiagen, une étape de déphosphorylation du vecteur a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales détaillées précédemment. La ligation a ensuite été

réalisée avec 100ng de vecteur et 10.5ng d'insert. 400U de T4 ADN ligase ont été ajoutés avec du tampon ligase (New England Biolabs Inc, Beverly, MA). Les minis-préparations d'ADN réalisées ont été criblées afin de vérifier la présence de l'insert U6Hp2. La digestion a été réalisée par les enzymes de restriction SnaBI/HpaI permettant d'isoler deux fragments si l'insert était présent de 7059pb et de 850pb et de 7409 et 350pb en absence de l'insert (Figure 15).

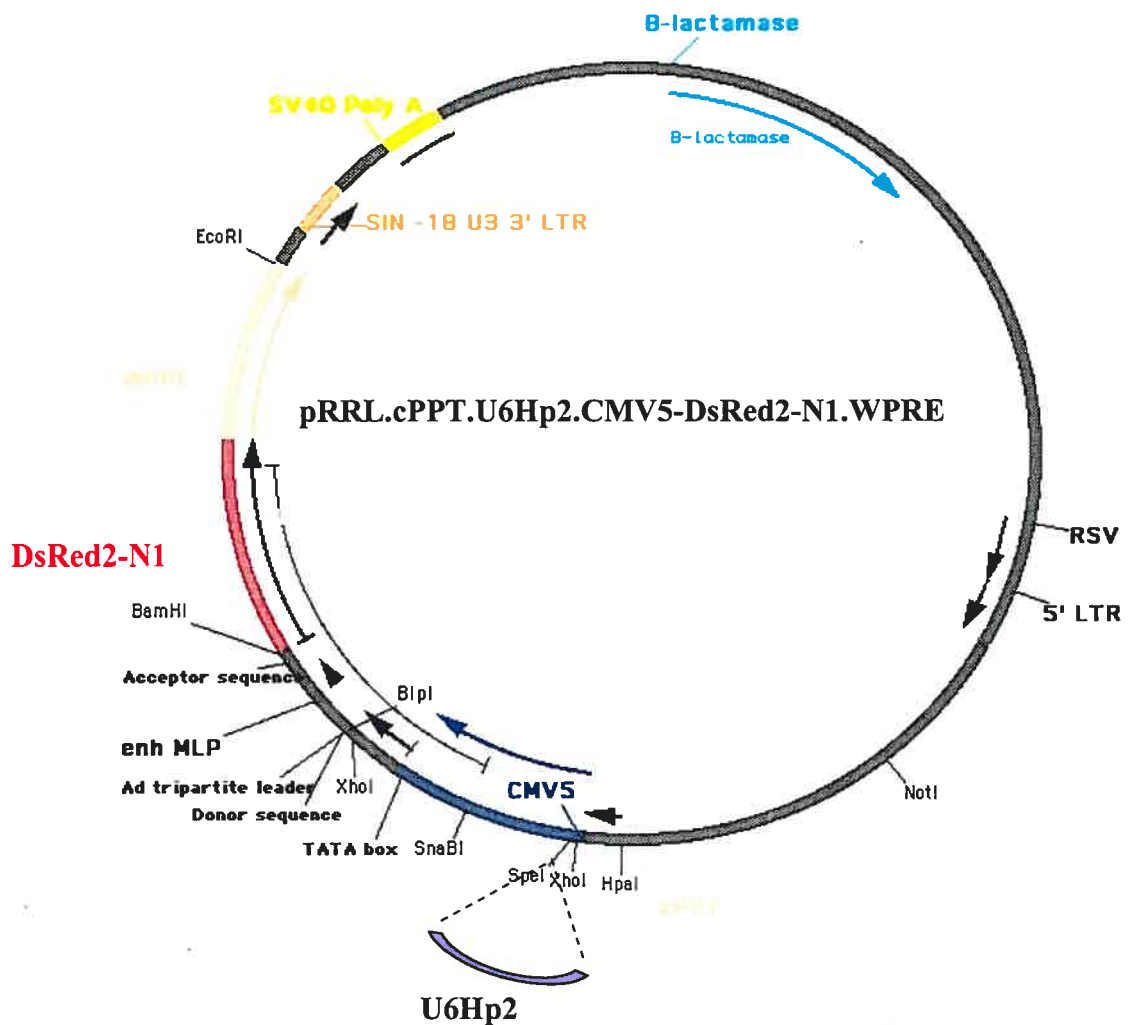


Figure14 : Représentation schématique de pRRL.cPPT.U6Hp2.CMV5DsRed.WPRE

Le vecteur de transfert lentiviral comprend la cassette d'expression U6Hp2 insérée au niveau du site de restriction SpeI entre le cPPT (central polypurine tract) et le promoteur CMV5 suivie de la cassette d'expression du gène rapporteur DsRed2-N1 placée sous le contrôle du promoteur CMV5. La région activatrice dans le LTR 3' a été largement tronquée afin de générer des vecteurs SINS. Ces vecteurs possèdent un LTR 5' hybride dans lequel la région U3 a été remplacée par un activateur /promoteur constitutif hétérologue. L'élément WPRE introduit en aval du gène d'intérêt permet d'augmenter l'expression en augmentant les modifications post-transcriptionnelles des ARNm et donc la traduction. SV40 polyA : signal de polyadénylation du virus SV40. LTR : Long Terminal Repeats. β -Lactamase : gène de résistance à l'ampicilline.

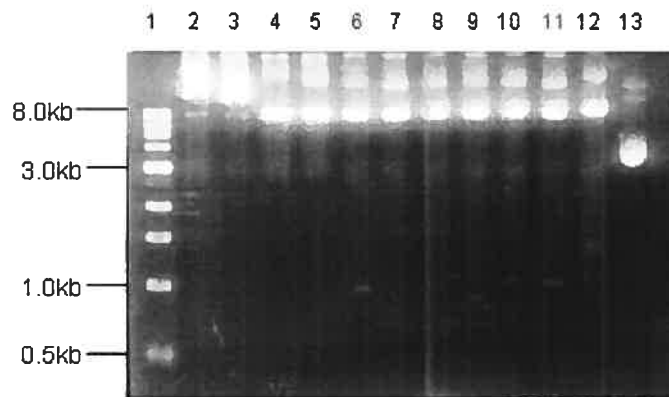


Figure 15 Vérification de la présence de la cassette d'expression U6hp2 dans le vecteur lentiviral pRRL.cPPT.CMV5DsRed2-N1-WPRE par les enzymes de restriction SnaBI/HpaI.

Ligne 1: échelle d'ADN 1kb ; Lignes 2 et 3: clones 6 et 7 non digérés ; Lignes et 5: clones 6 et 7 digérés par SnaBI ; Lignes 6 à 13: clones digérés par SnaBI et HpaI ; Lignes 6 et 11: clones positifs pour la présence de l'insert U6hp2.

2-2 Les lignées cellulaires utilisées et méthodes de transfection

2-2-1 Les lignées cellulaires utilisées

Les cellules 293A sont des cellules transformées qui proviennent de fibroblastes rénaux humains (46). Ces cellules possèdent la région E1 des adénovirus humains nécessaires à leur propagation. Les cellules 293CymR sont des cellules 293A qui expriment le répresseur de l'opéron cumate. Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales humaines d'un carcinome cervical transformées par le papillomavirus 18 humain (Henrietta Lacks, 1951). Les cellules 293A, 293CymR et HeLa ont été maintenues dans du milieu Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) (Life Technologies, Burlington, ON) supplémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS) ainsi que de 2mM de L-Glutamine. La lignée cellulaire H-59, ayant un potentiel élevé à former des métastases dans le foie, est dérivée d'un carcinome des poumons de Lewis (16) et nous a été gracieusement donnée par le Dr Pnina Brodt. Ces cellules adhérentes sont maintenues dans du milieu RPMI supplémenté de 10% de FBS additionné de 2mM de L-Glutamine.

Les lignées cellulaires JMO1 et JMO5 sont dérivées de carcinomes mammaires murins et ont été gracieusement données par le Dr Anne Lenferink (Institut de Recherche en Biotechnologies, Montréal). Ces cellules ont été maintenues dans un milieu contenant 50% (v/v) de DMEM et de milieu HAM'S F-12X.

Les cellules ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂.

2-2-2 Méthode de transfection

Des transfections transitoires ont été réalisées sur les cellules 293A par lipotransfection. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture 6 puits à une densité de 5×10^5 cellules par puits 24h avant la transfection. Pour chaque puits 4.2ul de réactif de lipofectamine (LipofectamineTM2000, Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) a été utilisé pour 3ug d'ADN total. La transfection a été réalisée suivant le protocole indiqué c'est à dire que la Lipofectamine a d'abord été diluée dans 100ul de milieu DMEM sans sérum pour ensuite être mélangée (dans un intervalle de temps n'excédant pas 5min) à l'ADN dilué au préalablement

dans 100ul de milieu DMEM sans sérum également. 30min après incubation, les complexes ADN-lipofectamine ont été rajoutés aux cellules dont le milieu avait été remplacé par 1.8mL de milieu frais. Les cellules sont incubées 48h avant de procéder à l'analyse de l'expression des gènes transfectés.

2-2-3 Construction de la lignée cellulaire 293CymRIGF-IR

Les plasmides pAdCMV5-P2DC-IGF-IR-S-GFPq/mlp-PS et le plasmide pHygro (exprimant le gène de résistance à l'hygromycine) ont été linéarisés par digestion par l'enzyme PacI (2U/ μ g d'ADN) dans le tampon NEBuffer #1 (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) additionné de BSA (0.1 μ g/ μ L). Les plasmides ont été purifiés par extraction au phénol-chloroforme et l'ADN du culot a été resuspendu dans du tampon TE 1X pH 8 stérile et a été quantifié sur gel d'agarose 1%. Des pétris de 60mm ont étéensemencés la veille avec 5×10^5 cellules 293CymR et ces cellules ont été transfectées à la lipofectamine (Lipofectamine TM2000, Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) avec les plasmides linéarisés selon le protocole optimisé décrit précédemment. 48h post-transfection, les cellules sont transférées dans des pétris de 100mm et de l'hygromycine est ajoutée au milieu à des concentrations variables allant de 50 μ g/mL à 300 μ g/mL. Le milieu a été remplacé par du milieu frais deux fois par semaines jusqu'à l'obtention de colonies de cellules résistantes assez importantes pour être clonées. Les cellules ont été préalablement induites avec 200ug/ml de cumate afin qu'il y ait expression du gène rapporteur GFPq (la GFPq est une version mutée de la GFP la rendant plus fluorescente) permettant d'identifier visuellement les cellules ayant incorporé le gène spécifique d'intérêt. En combinant cette méthode avec l'utilisation d'un micromanipulateur (le QuixellTM) (23), les cellules exprimant la GFPq ont été clonées individuellement. De façon simplifiée, le Quixell est constitué d'une station automatisée comprenant une caméra vidéo reliée à un microscope à fluorescence ainsi qu'à un bras robotisé muni d'un micro-capillaire en verre le tout sous contrôle d'un microprocesseur. La station est déplacée grâce à une manette jusqu'à que la cellule d'intérêt soit visualisée pour être ensuite aspirée par le micro-capillaire. La station est ensuite déplacée automatiquement et la cellule est expulsée dans une plaque 96 puits. Comme les cellules doivent être maintenues à l'extérieur de l'incubateur pour une heure voire plus, du milieu Leibowitz L-15 permettant de maintenir un pH stable à température ambiante est utilisé

à la place du DMEM. Toutes les considérations spécifiques à cette méthode en ce qui concerne les conditions de stabilité du pH, de la non-adhésion et de la stérilité des cultures ont été optimisées et décrites préalablement (23). Les cellules ont été placées ensuite dans une plaque 96 puits et amplifiées dans du milieu DMEM. Les différentes populations clonales ont ensuite été analysées par cytofluorométrie en flux Epics XL-MCL (Beckman-Coulter) en conditions induites et non induites au cumate.

2-3 Production virale

2-3-1 Génération d'adénovirus recombinants par la sélection positive avec la protéase adénovirale.

Depuis leur développement dans les années 1980, les vecteurs adénovirus ont été largement utilisés dans des expériences de transfert de gène pour la vaccination, la thérapie génique et des études fonctionnelles. La capacité à construire rapidement des bibliothèques adénovirales constitue un avantage majeur dans l'ère de la post-génomique. Une méthode idéale pour la construction de bibliothèques adénovirales devrait assurer l'unique sélection d'AdVs recombinants et la génération d'un très grand nombre de clones suivant la transfection de cellules permissives. Afin de minimiser le travail de criblage des virus recombinants des virus parentaux, des gènes rapporteurs peuvent être utilisés comme les protéines fluorescentes vertes ou rouges (GFP ou RFP) qui peuvent être utilisées dans le génome viral pour un criblage négatif ou dans le vecteur de transfert comme un criblage positif. Un système de sélection positive compatible avec la génération d'un très grand nombre de clones AdVs a été développé dans le laboratoire du Dr Massie, système basé sur la ré-expression ectopique d'un gène essentiel de telle sorte que seuls les génomes viraux ayant incorporés ce gène pourront pousser dans un environnement sélectif (39) Ce système a été utilisé dans notre étude. Le gène de la protéase PS des adénovirus est un des gènes tardifs essentiels impliqués dans de nombreuses étapes du cycle viral comme nous l'avons mentionnée auparavant. Le gène PS, n'étant pas requis pour la réplication de l'ADN, les adénovirus mutants dont le gène de la protéase a été enlevé (Δ PS) sont capables d'une seule ronde de réplication dans des cellules complétant les fonctions E1 en *trans*. Avec ce système le virus parental est éliminé après une ronde de réplication (Figure 16) Ceci a été réalisé en transfectant dans des cellules 293 un plasmide comprenant l'ITR gauche, une

cassette d'expression exprimant différents fragments antisens du gène IGF-IR en configuration dicistronique avec la GFPq et avec une région permettant la recombinaison homologue dans la région E1. En parallèle, le génome viral parental Δ PS (contenant la région E3) fut introduit par infection. Etant donné que ce mutant ne peut effectuer qu'une ronde de réplication dans les cellules 293, seuls les génomes ayant récupéré le gène PS peuvent conduire à une infection productive. Ainsi, afin de produire les virus AdCMV5DsRed/MLP-PS/U6hp2, AdCMV5-P2DC-IGF-IR-(AS)-GFPq/K7PSmlp et AdCMV5-P2DC-IGF-IR-AS(309)-GFPq/K7PSmlp, 1×10^6 cellules 293A ont été infectées avec le virus parental AdCMV5-P2DC-GFPq à une m.o.i de 0.3. Les cellules sont alors placées sur agitateur à 37°C pendant environ 4h. Après avoir remplacé le volume d'infection par du milieu frais, 3 μ g des plasmides respectifs à chacun des virus ci-dessus ont été préalablement linéarisés par l'enzyme PacI (afin de permettre la recombinaison avec le génome parental) et ont été transfectés avec 4 μ L de lipofectamine (LipofectamineTM2000, Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON). 48h à 72h post-transfection du milieu est rajouté, et les cellules sont incubées jusqu'à l'observation d'un effet cytopathique total. Le milieu est alors récolté et soumis à trois cycles de gel/ dégel afin de faire éclater les cellules et donc de provoquer le relargage des particules virales. A cette étape, le stock viral constitué à un titre approximatif de 1×10^4 ufp/mL. Afin de s'assurer de la non contamination par le virus parental, une ronde de purification supplémentaire a été réalisée pour chacun des virus. Pour cela, 24h avant infection, une plaque 6 puits pour chacun des virus a été préparée avec 5×10^5 cellules 293A par puits. Le lendemain, des dilutions sériées de chacun des virus ont été réalisées (de 10^{-1} à 10^{-6}) et rajoutées sur les cellules. 24h après, le volume d'infection est enlevé et remplacé par un mélange de milieu frais et de 1% d'agarose Sea Plaque GTG (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME). Le milieu figé, les cellules sont incubées environ 10 jours à 37°C et les plages de lyse individuelles et exprimant le gène rapporteur (GFP ou RFP) sont éluées dans 1mL de milieu frais et laissées à 37°C afin de dissoudre l'agarose. Les éluations sont ensuite utilisées afin de réamplifier le virus afin de constituer des stocks prêts à être titrés.

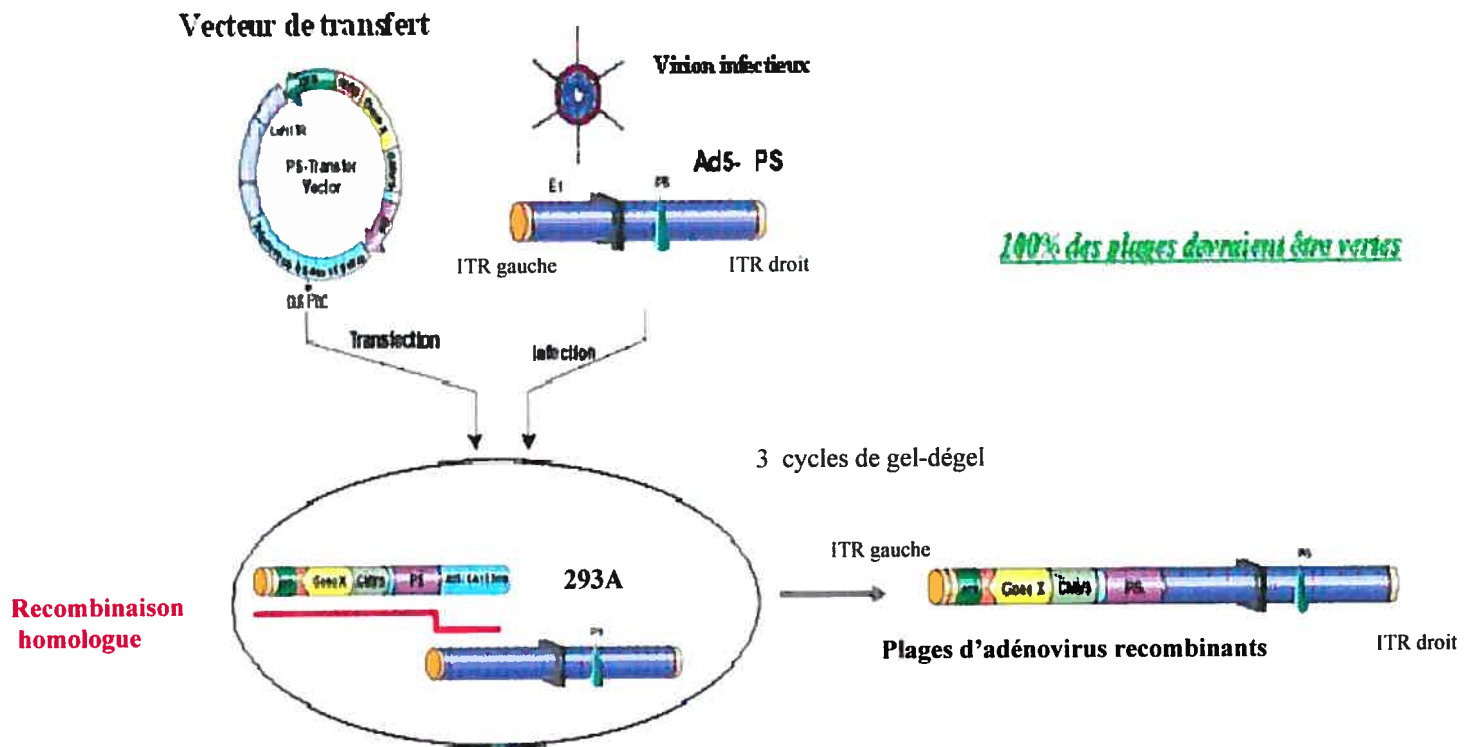


Figure 16 : Représentation schématique des étapes réalisées afin de générer des AdVs recombinants par sélection positive avec la protéase PS. Les recombinants montrés représentent des AdVs de première génération. Le vecteur de transfert contient une partie du génome Ad5 permettant la recombinaison (9.4 à 15.5 unités), une cassette d'expression contenant le gène de la protéase PS, différents fragments antisens à IGF-IR en configuration dicistronique avec le gène rapporteur de la GFPq à la place de la région E1. Après linéarisation, le vecteur de transfert a été transfecté dans des cellules 293 en combinaison avec la livraison du virus parental par infection de cellules 293. Comme les Ad Δ PS ne peuvent produire de plages dans les cellules 293, seuls les génomes ayant récupérés le gène de la protéase PS par recombinaison produisent des plages et peuvent ainsi être purifiés.

2-3-2 Titration des stocks viraux par cytofluorométrie

Le principe de la titration par cytofluorométrie est basé sur l'existence d'une relation linéaire entre le pourcentage de cellules infectées (exprimant la GFPq ou la RFP) et la multiplicité d'infection. Des dilutions effectuées en duplicata ont d'abord été effectuées à partir du stock viral initial. Des pétris de 60mm ont étéensemencés avec 5×10^5 cellules 293A qui sont infectées 24h après avec 1ml des dilutions virales effectuées et incubées 24h à 37°C sous agitation. Les cellules sont ensuite récoltées et fixées à la paraformaldéhyde (concentration finale 1%) et incubées sur glace pendant environ 30 min avant d'être analysées au cytofluoromètre XL-MCL (Beckman-Coulter). La GFPq des cellules est excitée par un laser argon de 15mW à 488nm et la fluorescence est détectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 525nm. Le pourcentage des cellules GFPq positives a été utilisé ultérieurement pour les calculs de détermination du titre (Figure17). Le virus AdCMV5GFPq est utilisé dans le laboratoire comme un contrôle, son titre ayant été déterminé sur des cellules 293A à 1×10^{10} ufp/ml par cytofluorométrie en flux et par essai de plages.

a)

Dilutions du stock viral (V)	Nombre de cellules totales (C)	Pourcentage de cellules GFP positives (Y)	V/C	-LN(1-Y)
0,00E+00	1,20E+06	0,00%	0,00E+00	0
3,00E-06	1,20E+06	2,06%	2,50E-12	0,02081514
1,00E-05	1,20E+06	4,03%	8,33E-12	0,041134543
4,00E-05	1,20E+06	10,67%	3,33E-11	0,112832808
1,00E-04	1,20E+06	15,48%	8,33E-11	0,168181993
3,00E-04	1,20E+06	17,12%	2,50E-10	0,187776407
1,00E-03	1,20E+06	34,23%	8,33E-10	0,419006379
pente(m)	4,50E+08			

b)

Virus	Titres obtenus (ufp/mL)
AdCMV5DsRed/U6hp2/PSmlp	4,50 x 10⁸
AdCMV5DsRed/PSmlp	2.0 x 10⁸
AdCMV5-P2DC-IGF-IR(AS)-GFPq/K7PSmlp	3.17 x 10⁷
AdCMV5-P2DC-IGF-IR(AS)309-GFPq/K7PSmlp	3.07 x 10⁹

Figure 17 Titrage des adénovirus recombinants exprimant les gènes rapporteurs GFPq ou RFP par FACS. a) Exemple de résultats de titrage de la GFPq de l'adénovirus AdCMV5DsRed/U6hp2/mlp-PS. La fonction mathématique utilise la méthode des moindres carrés afin de calculer la droite optimale de la courbe $f(V/C) = -\ln(1-Y)$ permettant de calculer la pente (m) dont l'équation est $y = mx + b$. La pente correspond au titre du virus et seules les dilutions donnant moins de 50% de cellules infectées sont prises en compte afin de rester dans la portion linéaire de la courbe. b) Tableau récapitulatif des titres obtenus pour les différents virus, les titres sont exprimés en ufp/ml.

2-3-3 Génération de Lentivirus SIN et de populations stables exprimant le hp2

Production de Lentivirus SIN

Le lentivirus que nous avons produit fait partie de la dernière génération des LVs et est incapable de se répliquer. Il est donc nécessaire de fournir les constructions d'encapsidation codant les protéines virales en *trans* pour sa production.

Afin de générer le lentivirus exprimant le hp2, nous avons utilisé la lignée cellulaire d'encapsidation 293SF-Pac LV développée dans le laboratoire pour la production efficace de vecteur LV SIN (Self-Inactivating Lentivectors). La conception de cette lignée est basée sur le contrôle des gènes VSVg et Rev par un système de promoteurs inductibles pour contrôler de façon indépendante les éléments d'encapsidation. Le vecteur pRRL.cPPT.U6Hp2.CMV5-DsRed2-N1.WPRE apporte les séquences agissant en *cis* permettant une transduction efficace, une intégration dans le chromosome et l'expression du transgène. Environ 5×10^6 cellules 293SF-Pac-LV ont étéensemencées dans un pètri de 150mm et maintenues dans du milieu HSFM. 24h après, les cellules sont transfectées en utilisant environ 10µg de plasmide. 6h après la transfection, du milieu frais est rajouté additionné de cumate (100µg/ml) et de doxycycline (100µg/ml). 48h après, le milieu et les cellules sont récoltées et filtré à 0.45µm.

Les stocks sont conservés à -80°C.

Génération de populations stables 293 et H-59 exprimant hp2

Des cellules 293A et H-59 ont étéensemencées à une densité de 5×10^5 cellules et transduites par 500µl de lentivirus préalablement incubés à 37°C sans agitation pendant 30min avec un polymère cationique, le polybrène, à une concentration de 8µg/ml. L'utilisation du polybrène augmenterait la transduction d'au moins 10 fois en contrebalançant les effets électrostatiques répulsifs virus-cellule (charge globale négative) et possiblement en permettant de favoriser l'agrégation des particules virales en augmentant le taux de sédimentation du virus à la surface cellulaire (31;67). 48h après transduction, le milieu est remplacé par du milieu frais spécifique à chaque type cellulaire et l'expression du gène rapporteur vérifiée au microscope à fluorescence. Les cellules sont ensuite amplifiées et maintenues pendant une semaine dans des conditions standards avant d'effectuer une deuxième ronde de transduction dans les mêmes conditions décrites précédemment avant d'être clonées par le Quixell et amplifiées jusqu'à l'obtention d'une population assez importante. Les populations clonales sont ensuite analysées par cytofluorométrie en flux

2-4 Contrôle de l'expression génique

L'expression inductible contrôlée de protéines constitue un avantage indéniable au niveau des études fonctionnelles dans des systèmes hétérologues. Chez *Pseudomonas putida* F1, la voie de dégradation du p-cymène en son dérivé p-cumate (acide benzoïque) est constituée de 6 gènes organisés en opéron (cym) (38). L'opéron cym est suivi de l'opéron cmt qui est responsable de la dégradation du cumate. L'expression des gènes de ces deux opérons est régulée par une molécule répresseur de 28kDa (CymR) qui lie les séquences opérateurs en aval du site de transcription. CymR est capable de se lier à l'ADN seulement en absence de cymène ou cumate, les molécules effectrices. Dans le système CymR que nous avons utilisé, la construction rapporteur est constituée de trois composantes : un promoteur fort (CMV5)*, les sites de liaison au CymR (les séquences opérateurs CuO), le gène d'intérêt (IGF-IR avec la GFP en IRES) de telle sorte que les séquences opérateurs soient insérées en aval du site d'initiation de la transcription. La répression de l'expression génique est médiée par CymR lié aux sites opérateurs en absence de cumate. L'expression a lieu en présence de cumate ou simplement en absence du répresseur CymR. (Figure 18).

*Le promoteur CMV5 est un promoteur CMV amélioré permettant une augmentation de l'efficacité de l'expression de 5-10 fois en fonction des lignées cellulaires.

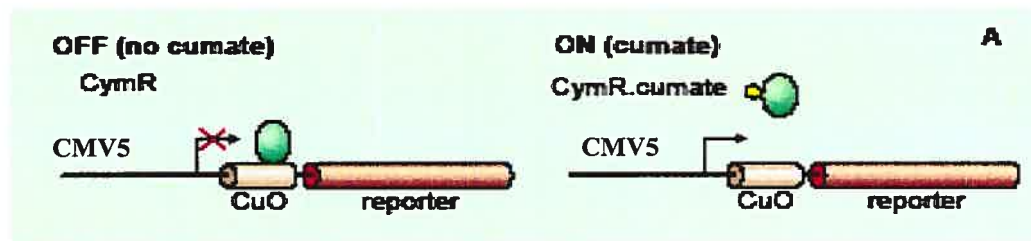


Figure 18 : Représentation schématique d'un système d'expression inductible au cumate en configuration répresseur. Le système est constitué du répresseur CymR et d'une construction rapporteur constituée de trois composantes : les sites de liaison au CymR (séquences opérateurs), les éléments du promoteur minimal et un gène rapporteur de telle sorte que les séquences opérateurs soient insérées en aval du site de transcription. En présence de cumate, celui-ci se fixe au répresseur qui ne peut plus se lier aux séquences opérateurs. La transcription peut donc avoir lieu.

2-5 Immunobuvardage

La vérification des profils d'expression de IGF-IR, de eIF-2 α et de l'actine a été effectuée par immunobuvardage. Le dosage des protéines totales des extraits cellulaires a été fait selon la méthode de Lowry (75) à l'aide de réactifs du kit de dosage de protéines DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). 5 μ l de chaque extrait sont déposés dans des plaques 96 puits et les réactifs ont été ajoutés selon le protocole du fabricant. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 750nm. Les concentrations en protéines ont été déterminées par comparaison à une courbe étalon établie avec des quantités connues de BSA. La migration par électrophorèse des protéines a été effectuée en utilisant un gel de polyacrylamide-SDS de 10% ou 12% de Novex (Invitrogen Corporation, Calsbad, CA). Chaque puits a été chargé avec 15-30ug de protéines et la migration a été effectuée pendant 2h30 à 120V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose HybondTM (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) et le transfert a été effectué soit pendant 16h (80mA par membrane) ou pendant 2 heures (à 375mA). L'efficacité du transfert est vérifiée en incubant la membrane dans du rouge ponceau (Ponceau S, Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Le réactif de blocage de la membrane ou saturation des sites non spécifiques dépend du mode de détection employé.

Pour la détection de IGF-IR, le kit de détection Pierce a été utilisé (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Brockville, ON). La membrane est d'abord bloquée dans du SuperBlock (Super Block Blocking Buffer in PBS, Rockford, IL) pendant 1h à température ambiante. Une solution de SuperBlock (concentration finale de 10%) diluée dans du PBS-Tween (0.1%) a été utilisée pour la dilution des anticorps primaires anti-IGF-IR β (IGF-IR β (C-20): sc-713 Santa Cruz Biotechnology, Inc Santa Cruz, CA) utilisé a une dilution de 1/2000 (temps d'incubation : 2h). Cet anticorps polyclonal de lapin, reconnaît la chaîne β de IGF-IR d'origine humaine, murine et de rat. La membrane est soumise à 3 lavages de 10min avec du PBS-Tween (0.1%) et incubée avec de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, a une dilution de 1/100 000 (temps d'incubation : 1h30) (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK). La membrane est soumise à 3 lavages de 10min avec du PBS-Tween

(0.1%) et incubée 15min avec le réactif de chimioluminescence pour ensuite être exposée sur un film Biomax MR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Pour la détection de eIF-2 α phosphorylé (P*-eIF-2 α) et de l'actine, le kit de détection utilisé est le système ECL (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, EN). La membrane est d'abord bloquée dans une solution de lait (concentration finale de 5%) diluée dans du PBS-Tween (0.1%) pour la détection de P*-eIF-2 α . Cette même solution de blocage sera utilisée pour la dilution des anticorps concernant seulement la détection de l'actine. Pour la détection de P*-eIF-2 α une solution de BSA (concentration finale de 5%) diluée dans du PBS-Tween (0.1%) sera utilisée pour la dilution des anticorps. Les anticorps primaires anti-actine sont utilisés à une dilution de 1/20 000 pendant 1h et les anticorps anti- P*-eIF-2 α (Phospho- eIF-2 α Ser51 antibody, Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA) à une dilution de 1/1000 dans leur solution de blocage respective. La membrane est soumise à des lavages et incubée avec l'anticorps anti-IgG de souris (pour la détection de l'actine) à une dilution de 1/10 000 et anti-IgG de lapin (pour la détection de P*-eIF-2 α). La membrane est ensuite lavée et incubée 1min avec le réactif ECL (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, EN) pour ensuite être exposée sur un film Biomax MR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Une quantification des bandes correspondant à la chaîne β d'IGF-IR a été réalisée par densitométrie (les films autoradiographiques sont préalablement scannés) grâce au programme d'analyse d'image, ImageJ (logiciel gratuit recommandé par le NIH). Une même surface a été déterminée pour chaque bande et l'intensité moyenne est alors mesurée par le logiciel. De la même façon, l'intensité du bruit de fond a été mesurée et a été soustraite à l'intensité moyenne mesurée. La densité est calculée en multipliant l'intensité moyenne et la surface. Le résultat est exprimé en unités arbitraires. Une normalisation par l'actine fut également réalisée. La mesure densitométrique des bandes d'actine a été réalisée de la même manière.

2-6 Génération d'une librairie adénovirale de fragments antisens IGF-IR utilisant la sélection positive

2-6-1 Préparation de la librairie plasmidique pour la transfection

L'enzyme exonucléase III (ExoIII) a été utilisée afin de générer des sous-clones contenant des délétions bidirectionnelles progressives de l'ADN de IGF-IR en orientation antisens (kit Erase-a-base® System, Promega, Madison, WI). L'exoIII est utilisée pour digérer spécifiquement des inserts d'ADN à partir d'extrémités franches ou 5'sortantes. Le plasmide pAdCMV5-P2DC-IGF-IR-AS(PL)/K7PSmlp a été linéarisé par BclI au niveau d'un site unique situé au milieu du gène laissant des extrémités 5' sortantes. La digestion par l'ExoIII s'effectue selon un taux uniforme permettant d'obtenir des délétions de taille prédéterminées en prélevant des aliquots de la réaction à des temps donnés. La réaction a été effectuée pendant 20min à 30°C ce qui correspondait à une délétion approximative théorique de 420pb par minute. Afin de déterminer l'étendue et l'efficacité de la digestion, pour chaque intervalle de temps, 100ng-150ng d'échantillon ont été visualisés sur gel d'agarose 1% et la migration a été effectuée à 60V pendant 3h afin d'obtenir une résolution optimale des bandes. Chaque pool a ensuite été recircularisé et directement transformé dans des bactéries ultracompetentes (TOP10 UltraCompetent Cells, Invitrogen, Carlsbad, CA). Les bactéries ainsi transformées ont été directement inoculées à 250ml de LB contenant 100µg/ml d'ampicilline, afin de produire deux maxi-préparation d'ADN (Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne) d'une grande diversité de clones exprimant des fragments de taille variables antisens à IGF-IR.

Les pools ainsi produits (pool*1 contenant des variants avec de longs inserts, pool*2 contenant des variants avec de courts inserts) ont été digérés par PacI coupant à l'extrémité 5' de l'ITR gauche. L'ADN linéarisé est ensuite purifié par un protocole standard au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). 150ul d'eau ont été ajoutés au volume de digestion par PacI. Un volume égal (200ul) de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) a été ajouté et vortexé. Le tout a été centrifugé pendant 1min à température pièce. La phase aqueuse a été transférée à un nouveau tube. 200µl de chloroforme ont été ajoutés et le mélange est vortexé. Le tout est centrifugé encore une fois 1min et la phase aqueuse transférée dans un nouveau tube. Deux volumes d'éthanol 100% et 1/10 de volume d'acétate de sodium

3M ont été ajoutés et la solution est incubée pendant 20min à -80°C . La solution est ensuite centrifugée pendant 10min et le culot est lavé avec 500 μl d'éthanol 70%. Le culot est ensuite séché et resuspendu dans 10 μl de TE stérile. L'ADN est alors prêt à transfecter.

2-6-2 Protocole d'infection/transfection afin de générer une librairie adénovirale

Le protocole utilisé se base sur le protocole déjà publié par notre laboratoire (88). Des cellules 293A ont étéensemencées à une densité de 1×10^6 cellules dans six pétris de 60mm 24h avant infection/transfection et incubées dans des conditions standards. Le milieu est ensuite enlevé et remplacé par du milieu frais DMEM contenant le virus parental Ad5- Δ [PS-E4(+orf6)] à des m.o.i de 0.3. Les pétris sont ensuite incubés selon des conditions standards avec agitation légère pendant 5h. Le milieu d'infection est ensuite remplacé par 3mL de milieu DMEM et les cellules sont incubées pendant 1h dans des conditions standards pour être ensuite transfectées avec l'ADN linéarisé de la librairie plasmidique. La transfection à la lipofectamine a été réalisée selon le protocole standard déjà décrit précédemment. Les cellules sont ensuite incubées dans des conditions standards pendant 3-4 jours pour être ensuite collectées ensemble avec le milieu et soumises à trois gels-dégels afin de permettre la libération des particules virales. Les minis stock viraux résultant (*1 et *2) représentent la librairie adénovirale initiale.

2-6-3 Détermination du titre viral approximatif de la librairie par essai de plages.

Le titre a été estimé rapidement en plaques 6 puits en utilisant le même protocole que pour une purification par plages décrite ci-avant. Donc, de façon rapide, des séries de dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} ont été réalisées pour chacun des minis-stocks viraux et 1mL de solution virale diluée a été utilisé pour infecter les cellules. Le lendemain, le milieu d'infection est enlevé et remplacé par une couche de 2.5mL de milieu DMEM contenant de l'agarose Sea Plaque GTG (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) à une concentration finale de 1%. Les pétris sont alors incubés pendant 10-15 jours jusqu'au comptage des plages. Le titre (ufp/ml) est alors évalué en multipliant le nombre de plages (d'un puits contenant entre 10 et 100 plages) par le facteur de dilution.

2-6-4 Isolement des clones viraux antisens individuels

Des cellules 293A ont étéensemencées à une densité de 1×10^6 cellules dans six pétris de 100mm 24h avant infection et incubées dans des conditions standards. Après avoir enlevé le milieu, pour chaque pétri, 6mL du mini stock de virus initial dilué à 50ufp/mL est utilisé afin d'infecter les cellules. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit dans des conditions standards avec faible agitation. Le milieu est alors enlevé et remplacé par une couche de 12mL de DMEM contenant de l'agarose Sea Plaque GTG (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) à une concentration finale de 1%. Après solidification de l'agarose, les pétris sont incubés dans des conditions standards pendant 2 semaines. Les plages virales représentant des clones recombinants uniques apparaissent 1 semaine post-infection. Afin de s'assurer que les plages repiquées correspondent bien à des clones recombinants et non à une possible contamination de virus parental, une confirmation par observation au microscope à fluorescence de l'expression de la GFP a été réalisée au préalable. Les plages des clones viraux recombinants sont alors repiquées et éluées dans 1mL de milieu DMEM. Environ 100 clones du mini-stock viral *1 et 100 clones du mini stock viral *2 ont été ainsi éluées. Les plaques de 24puits contenant les éluations sont incubées toute la nuit avant d'être stockées le lendemain à -20°C.

2-6-5 Amplification des clones viraux individuels

Des cellules 293A ont étéensemencées à une densité de 1×10^4 cellules par puits d'une plaque 96 puits dans 150µl de DMEM. Les cellules ont été ensuite infectées avec 50µl des plages éluées. Les plaques ont ensuite été incubées sous des conditions standards pendant 10 jours ou jusqu'à que l'effet cytopathique soit complet dans tous les puits. Les plaques sont ensuite soumises à trois cycles de gels/dégels afin que les particules virales soient libérées des cellules. Les clones ainsi amplifiés ont un titre approximatif de 10^9 ufp/mL. Étant donné que le volume d'amplification est petit et qu'une optimisation du criblage est nécessaire, une amplification subséquente de ces clones en 24 puits a été réalisée et de plus, environ 30 clones ont été choisis et amplifiés dans des plaques 6 puits afin de disposer d'un volume plus important dans les étapes optimisation.

2-7 Essais de criblage de la librairie adénovirale

2-7-1 Sur un modèle réplcatif : 293CymRIGF-IR

De cellules 293CymR ont étéensemencées à une densité de 5×10^5 cellules par puits dans des plaques de culture 6 puits 24h avant infection. Les cellules ont ensuite été infectées par les clones adénoviraux antisens à une m.o.i de 5, m.o.i estimée approximativement à la suite des amplifications successives. Ainsi, un volume identique de 20 μ l pour chaque clone a été inoculé aux cellules dans un volume total de milieu de 500 μ l. Les cellules sont ensuite placées à 37°C avec agitation lente pendant 6h. Le volume a ensuite été retiré et remplacé par 2ml de milieu frais contenant 150mg/ml de cumate. Les cellules ont ensuite été incubées 24h à 37°C avant d'être analysées par immunocytochimie. 24 clones adénoviraux ont été ainsi analysés. Les cellules ont d'abord été fixées avec une solution de formaldéhyde froide à une concentration finale de 2%. Les échantillons sont ensuite incubés jusqu'au lendemain à 4°C et centrifugés pendant 10min à 1500rpm. Le surnageant est enlevé et le culot est repris dans 1ml d'une solution de perméabilisation de Tween20 (0.2% dans du PBS) et incubé à 37°C pendant 15min dans un bain-marie. 1ml de solution de PBS additionné de 2% de sérum de veau fœtal et de 0.2% d'azide de sodium (solution A) est ajouté et la suspension est centrifugée pendant 10min à 1500rpm. Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire est repris dans 50 μ l de sérum de veau fœtal pendant environ 1min et 50 μ l de solutionA sont ajoutés contenant l'anticorps anti-IGF-IR α et anti-IGF-IR β à une dilution de 1/100 chacun. L'utilisation de deux anticorps reconnaissant les chaînes α externes et β internes permet d'augmenter l'intensité du signal. Les échantillons sont vortexés brièvement et incubés à 4°C jusqu'au lendemain. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois avec 10ml de solution Tween-20 à 0.2% par centrifugation à 1500rpm pendant 10min. Le culot est alors repris dans 50 μ l de sérum de veau fœtal et 50 μ l de solution A sont ajoutés contenant l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la phycoérythrine (PE) à une dilution de 1/5000. Deux lavages sont réalisés comme précédemment et le culot est alors repris dans 1ml de PBS avant d'être analysé par cytométrie en flux.

2-7-2 Criblage sur un modèle non-réplicatif : HeLa

Des cellules HeLa ont étéensemencées à une densité de 5×10^5 cellules par puits dans des plaques de culture 6 puits 24h avant infection. Les cellules ont ensuite été infectées soit par le virus contrôle AdCMV5IRESGFPq/K7mlpPS soit par les clones adénoviraux antisens à une m.o.i de 20 (estimée pour les clones antisens à partir des amplifications successives) et le volume correspondant a été inoculé pour un volume total de milieu frais de 0.5ml. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec agitation lente. 24h après infection, le volume d'infection est remplacé par 2mL de milieu frais et les cellules sont transfectées avec 3µg du plasmide pAdCMV5-P2DC-IGF-IR(S)-GFPq/mlp-PS. Les cellules sont encore incubées 24h et l'expression protéique est analysée par immunobuvardage.

2-8 Construction et analyse de l'efficacité de shRNA

2-8-1 Clonage de shRNAs

Les shRNAs ont été clonés après une seule amplification PCR suivant un protocole modifié publié (24). Le plasmide pTz (contenant le promoteur U6 humain) a été utilisé comme template. Le primer U6F utilisé dans toutes les réactions s'apparie à l'extrémité 5' du promoteur U6 humain (en gras) : 5' CGCCGGATCCAAGGTCGGGCAGGAAGAG 3'. Les autres amorces en sens reverse ont une extrémité 3' invariable complémentaire à l'extrémité 3' du promoteur U6 (en gras dans le Tableau 1) suivi par la séquence du shRNA (en bleu) incluant une boucle de 9pb pour le repliement, six bases A et une séquence de 12pb contenant le site de restriction Sall.

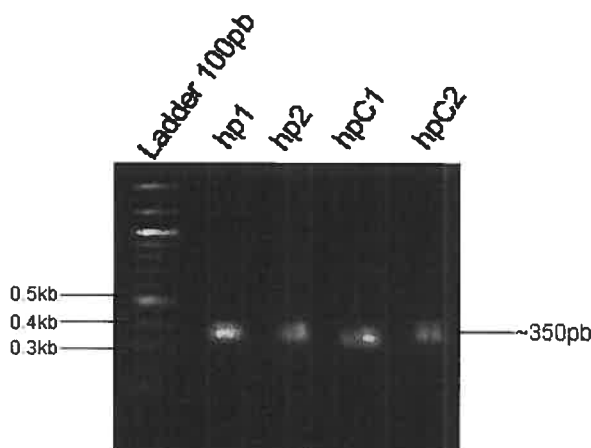


Figure 19: Confirmation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR des différents shRNAs. Ligne 1 : échelle d'ADN 100pb, Lignes 2 à 5 : fragments PCR correspondant à la cassette d'expression U6hp1, U6hp2, U6hpC1 ou U6hpC2 de 350pb.

Tableau 1 : Séquences des différents shRNAs

	Séquences	Position dans le gène IGF-IR
HP1 19mer	5'ACCTTCGTCGACAAAAAAGATCCGCCATTCTCATGCCTCTCTTGA AGGCATGAGAATGGCGGTGTTTCGTCCTT 3'	1168-1190pb
HP2 21mer	5'ACCTTCGTCGACAAAAAAGGATGGTGTCTTCACTACTCATCTCTT GAATGAGTAGTGAAGACACCATCCGGTGTTTCGTCCTT 3'	3559-3583pb
HPC1 19mer	5'ACCTTCGTCGACAAAAAAGCTACATTGTGGGGAACAAGTCTCTTG AACTTGTTCCCCACAATGTAGGGTGTTTCGTCCTT 3'	499-520pb
HPC2 19mer	5'ACCTTCGTCGACAAAAAAGCCCATGTGTGAGAAGACCTCTCTTG AAGGTCTTCTCACACATGGGCGGTGTTTCGTCCTT 3'	565-585pb

Les réactions ont été réalisées en utilisant l'enzyme High Fidelity (Expand High Fidelity PCR System, Roche Molecular Biochemicals, Mississauga, ON) dont les conditions étaient les suivantes :

94°C / 5min
 94 °C / 30sec
 53 °C / 30sec
 72°C / 30sec
 72°C / 7min
 4°C jusqu'à purification

} 20 cycles

Les fragments PCR d'une taille de 350pb ont été visualisés sur gel d'agarose 1%, et purifiés en utilisant le kit Qiagen. Une queue poly-A a ensuite été rajoutée à l'extrémité 3' de ces fragments PCR grâce à la Taq DNA polymerase et les fragments ont ensuite été clonés dans le plasmide pPCR2.1 contenant des extrémités 5' T cohésives afin de faciliter le clonage (TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Les cellules ultracompetentes TOP10 (UltraCompetent Cells, Invitrogen, Carlsbad, CA) ont été utilisées pour la transformation. Les bactéries ont été cultivées à 30°C afin de minimiser la recombinaison au niveau des régions palindromiques des shRNAs. Une sélection au X-Gal (40mg/ml) a été réalisée. Les colonies blanches contenant l'insert ont donc été sélectionnées. Les minis-préparations d'ADN de ces clones sélectionnés ont été ensuite criblées par digestion enzymatique BamHI/SalI afin de vérifier la présence du

shRNA Une confirmation a été réalisée par séquençage automatisé en utilisant une amorce dans le promoteur T7 de pPCR2.1 ou dans le promoteur U6 (2pmol), 4uL de mélange dRhodamine. La réaction a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystem, Foster city, CA). Le cycle de séquençage utilisé était le suivant :

94°C / 3min	
94 °C / 30sec	} 45 cycles
53 °C / 30sec	
60°C / 4min	
4°C jusqu'à purification	

La purification des échantillons se fait sur colonne Centri-Sep comme il a été décrit précédemment. Les échantillons sont ensuite envoyés au service de séquençage de l'Institut de Recherche en Biotechnologies.

2-8-2 Analyse de l'expression de la GFP et de la RFP par cytométrie en flux

Les émissions de la GFP et de la RFP ont été analysées par cytofluorométrie en flux EPICS XL-MCL (Coulter, Miami, Fla) équipé d'un laser argon de 15mW de 488nm et de 550nm et la fluorescence est détectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 525nm. Les données sont collectées en utilisant le système MDADS (Multiparameter Data Acquisition and Display System). L'expression de la GFP et de la RFP a été quantifiée par l'index de fluorescence (pourcentage de cellules positives GFP ou RFP multiplié par l'intensité moyenne de fluorescence). Un exemple d'analyse par cytométrie en flux est présenté ci-après.

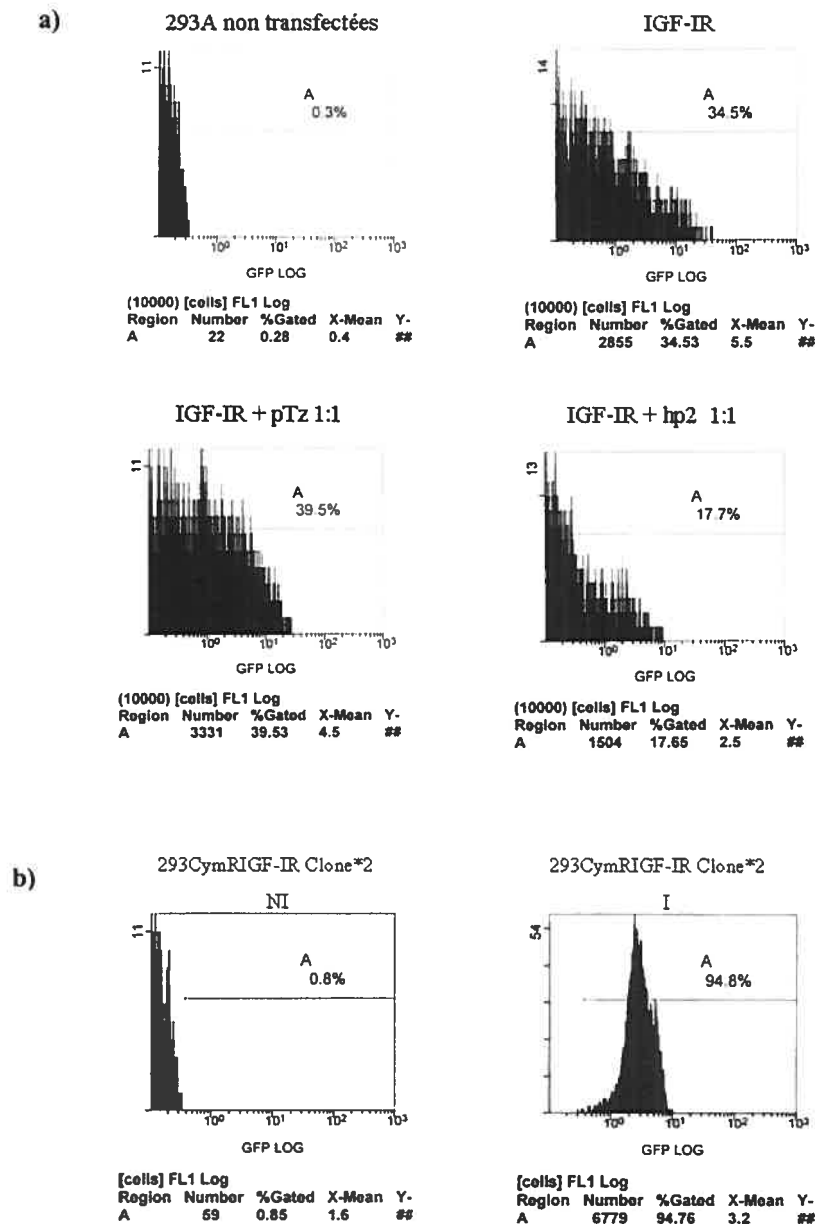


Figure 20 : Exemples d'analyse par cytométrie en flux. a) Le nombre de cellules analysé a été fixé à 10 000 et des cellules 293A non transfectées (contrôle négatif) ont permis de régler les paramètres de l'appareil pour ce type cellulaire et de définir le seuil de positivité. En multipliant l'intensité moyenne de fluorescence («X-mean ») par le pourcentage de cellules GFP positives (ou le nombre de cellules GFP positives), l'index de fluorescence a été calculé (30) b) De la même façon, cet index de fluorescence a été calculé dans les conditions induites (I) ou non-induites par le cumate pour la population clonale 293CymRIGF-IR (clone*2). A partir de cette donnée, le ratio I/NI en fut déduit. L'observation d'un pic net c'est à dire ne comportant pas de pics secondaires majeurs permet de valider la stabilité de ce clone.

3-RESULTATS

3-1 Expression de IGF-IR et validation des constructions pAdIGF-IR(S) et pAdIGF-IR(AS).

Le récepteur IGF-IR est une protéine qui est retrouvée à la surface de presque tous les types cellulaires à l'exception des lymphocytes T et des hépatocytes. Cependant, les niveaux d'expression de ce récepteur sont variables entre les types cellulaires. Nous avons donc, au préalable, évalué les niveaux d'expression d'IGF-IR endogène dans les différentes lignées utilisées tout au long du projet (excepté la lignée JMO5 analysée à titre d'exemple mais non utilisée dans la suite des expériences). Des lysats cellulaires de lignées, humaines (HeLa, 293A) ou murines (NIH 3T3, H-59, JMO1, JMO5) ont été analysés par immunobuvardage (Figure 21). L'expression de IGF-IR est variable dans les différentes lignées et suffisante pour être analysée par cette technique. Les cellules NIH 3T3 exprimant des niveaux relativement importants d'IGF-IR sont utilisées par la suite comme contrôle positif de l'expression du récepteur.

Afin d'étudier l'efficacité de constructions antisens sur l'IGF-IR murin, l'ADNc pleine longueur (4417pb) de ce récepteur a été cloné à partir d'un plasmide (gracieusement donné par le Dr Brodt) dans le plasmide adénovirus de transfert pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp au niveau du site de clonage BglII. En plus de contenir la cassette d'expression de la protéase utilisée pour la sélection des recombinants adénoviraux, ce vecteur contient aussi une cassette d'expression dans laquelle la séquence d'IGF-IR précédée du promoteur CMV5 est suivie d'une séquence d'attachement interne des ribosomes (IRES) et du gène codant pour la GFPq, permettant le suivi de l'expression du gène. L'ADNc du récepteur a été cloné en orientation sens et antisens, pAdIGF-IR(S) et pAdIGF-IR(AS) respectivement dans ce plasmide. Afin de vérifier la validité des constructions, des lysats cellulaires de cellules 293A transfectées par pAdIGF-IR(S) ou pAdIGF-IR(AS) ont été analysés par immunobuvardage (Figure 22). L'expression d'IGF-IR, caractérisée par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant à la fois la forme précurseur (200kDa) et mûre (chaîne β de 95kDa), a été mise en évidence à partir de la construction pAdIGF-IR(S). L'expression basale d'IGF-IR obtenue à partir de la construction pAdIGF-IR(AS) correspond au niveau de récepteur endogène mis en évidence dans les cellules

293A non transfectées. Deux bandes d'intensité et de taille presque équivalentes au niveau de la forme précurseur ont été observées dans les expériences dans lesquelles la construction pAdIGF-IR(S) fut transfectée de façon transitoire. Dans ces conditions, le récepteur étant exprimé à des niveaux supra-physiologiques et le processus de maturation des protéines étant saturable (au cours duquel ont lieu des modifications post-traductionnelles) il est possible d'obtenir deux profils de glycosylation différents d'une même protéine. Toutefois, afin de simplifier l'interprétation, l'analyse de l'expression d'IGF-IR a toujours été effectuée sur l'expression de la chaîne β de 95kDa.

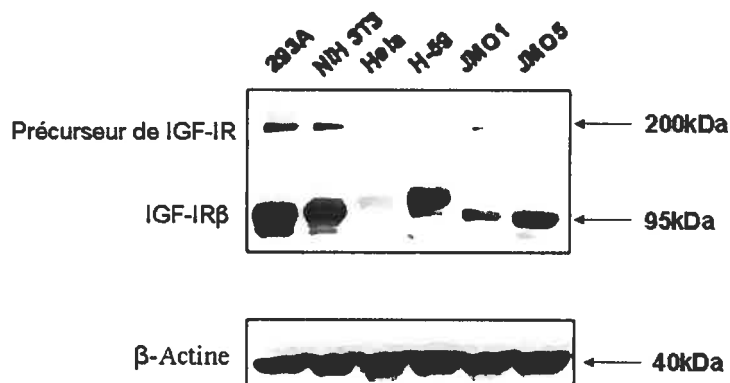


Figure 21 Expression d'IGF-IR dans différentes lignées cellulaires. Le récepteur IGF-IR est exprimé par presque tous les types cellulaires. Les niveaux d'expression de ce récepteur ont été évalués dans des lignées humaines (HeLa, 293A) et dans des lignées murines (NIH 3T3, H-59, JMO1 et JMO5) par immunobuvardage. Un anticorps reconnaissant à la fois la forme précurseur (200kDa) d'IGF-IR et la chaîne β (95kDa) a été utilisé, cet anticorps polyclonal reconnaît la chaîne β d'IGF-IR d'origine humaine, murine et de rat. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits. La lignée NIH 3T3 est utilisée comme contrôle positif de l'expression d'IGF-IR. Afin de détecter IGF-IR dans toutes les lignées, 30 μ g de protéines ont été chargées sur gel.

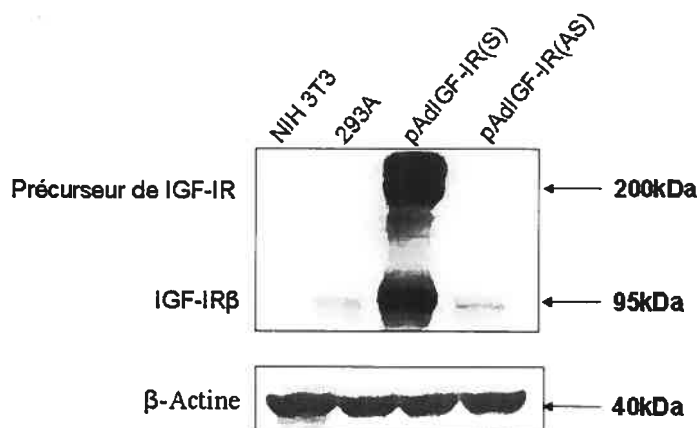


Figure 22 Vérification de l'expression d'IGF-IR à partir du plasmide pAdIGF-IR(S). Des cellules 293A ont été transfectées avec les plasmides pAdIGF-IR(S) ou pAdIGF-IR(AS) exprimant le gène codant pour IGF-IR respectivement en orientation sens ou antisens. L'expression de la protéine IGF-IR a été vérifiée par immunobuvardage. Un anticorps reconnaissant à la fois la forme précurseur d'IGF-IR (200kDa) et la chaîne β mûre (95kDa) a été utilisé. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits. L'expression de IGF-IR étant importante en transfection transitoire, 10 μ g de protéines ont seulement été chargées sur le gel ce qui rend la détection de IGF-IR β dans les NIH 3T3 plus difficile au temps d'exposition présenté.

3-2 Construction et validation de la lignée 293CymRIGF-IR

Afin d'évaluer l'efficacité de différentes constructions antisens contre le récepteur IGF-IR, une lignée cellulaire surexprimant le transgène IGF-IR a été construite. Les cellules 293CymR exprimant l'opéron cumate ont été co-transfectées par le plasmide exprimant le gène codant pour IGF-IR en orientation sens et par un plasmide exprimant le gène de résistance à l'hygromycine. Ces deux plasmides sont préalablement linéarisés afin de permettre leur intégration de façon aléatoire dans le génome cellulaire. Afin de sélectionner les transfectants stables, une sélection à l'hygromycine (concentration de 150mg/mL) doit être maintenue. La concentration choisie a permis d'éliminer majoritairement les cellules sensibles à l'hygromycine. Après deux à trois semaines, les cellules résistantes forment des foyers cellulaires assez importants pour subir une deuxième sélection. Le gène IGF-IR étant exprimé avec la GFP à partir d'un ARNm dicistronique, une deuxième sélection par ce gène reporter a été réalisée. Les cellules ont été clonées grâce au Quixell qui permet l'isolement d'une seule cellule ayant les caractéristiques désirées, ici l'expression de la GFP (23). Environ 80 clones ont été ainsi isolés et maintenus avec du milieu frais additionné d'hygromycine pendant environ 4-6 semaines. Afin de vérifier la fonctionnalité et l'efficacité du promoteur CMV5CuO contenant l'opérateur cumate, les différents clones ont été placés dans des conditions induites (I) c'est à dire contenant une concentration de cumate de l'ordre de 200mg/mL ou non-induites (NI) c'est à dire dans du milieu exempt de cumate. 48h après induction, l'expression de la GFP de cinq clones a été analysée par cytométrie en flux (Figure 23-a) et l'expression d'IGF-IR par immunobuvardage (Figure 23b). L'efficacité du promoteur inductible au cumate a déjà été démontrée préalablement et se traduit dans nos conditions expérimentales par l'obtention de ratio I/NI très élevé pour certains clones (les clones *1 et *4 ont des ratios de respectivement 411 et 350). L'utilisation d'une cassette d'expression dicistronique permet de comparer les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt dans différentes conditions indirectement par la mesure de l'intensité de fluorescence de la GFP (85). Le niveau d'expression de la GFP correspond au niveau d'expression d'IGF-IR mais nous nous sommes assurés qu'il y avait expression de la protéine IGF-IR. Il est à noter également qu'une surexposition du film

autoradiographique était nécessaire afin de visualiser l'expression d'IGF-IR en conditions non induites par le cumate.

Le clone*2 fut sélectionné parmi les cinq analysés de façon aléatoire, tous les clones satisfaisant les critères - ratio I/NI élevé et homogénéité de la population clonale (visualisée par un pic net en cytométrie en flux), ainsi qu'une expression élevée de IGF-IR (Figure 23-b).

a)

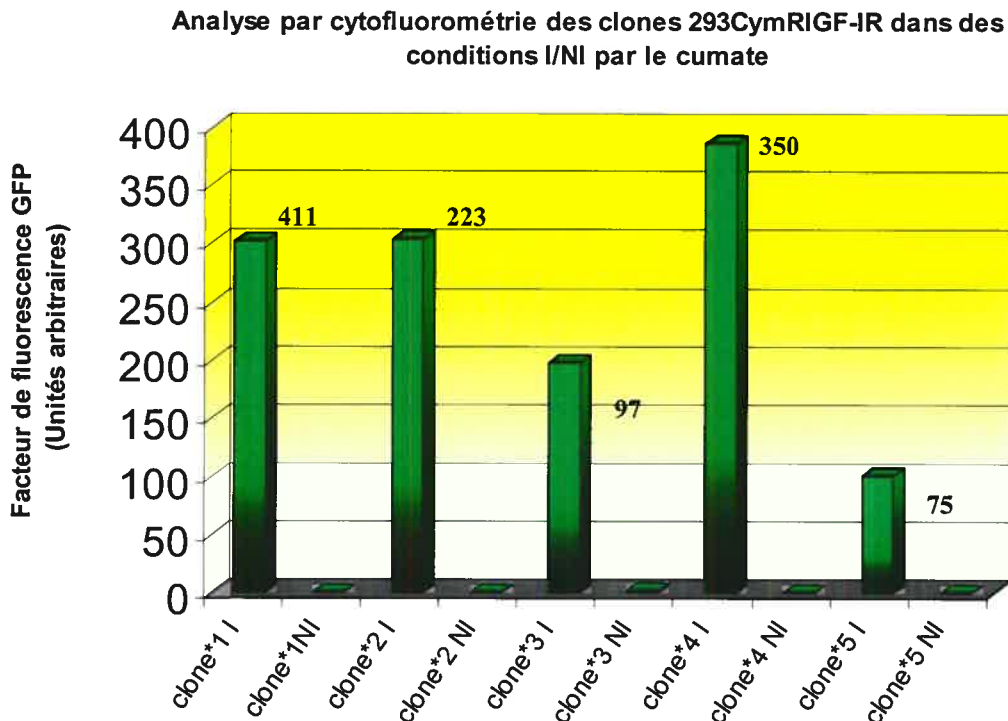
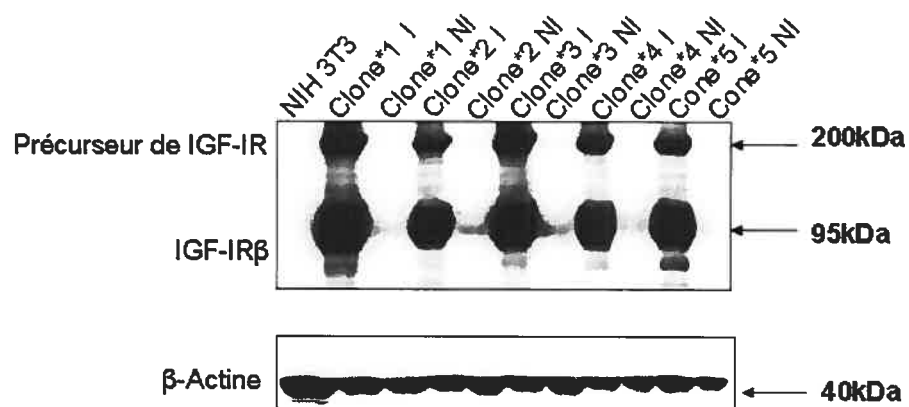


Figure 23 Validation de la lignée cellulaire 293CymRIGF-IR. La lignée cellulaire 293CymRIGF-IR a été générée par sélection à l'hygromycine. Les transfectants stables expriment le récepteur avec la GFP à partir d'un ARNm dicistronique. Le récepteur est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate. 48h après induction (I) au cumate ou non-induction (NI) cinq clones sont analysés. **a)** Analyse de l'expression de la fluorescence de la GFP de différentes populations clonales par cytométrie en flux. Les ratios I/NI sont calculés à partir des index de fluorescence de la GFP et sont indiqués sur le graphe pour chaque clone. **b)** Vérification de l'expression de IGF-IR dans les cinq clones par Western-Blot. Les cellules NIH 3T3 sont utilisées comme contrôle positif de l'expression d'IGF-IR et l'actine comme contrôle du niveau de protéines chargé dans chaque puits.

b)



3-3 Efficacité des constructions antisens pAdIGF-IR(AS) et pAdIGF-IR(AS) 309 mesurée par le système reporter IGF-IR/GFP

Les deux constructions antisens à IGF-IR, l'ADNc pleine longueur PL de 4417pb et le fragment de 309pb ont été clonés séparément dans le vecteur viral pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp. Les étapes de la construction de pAdIGF-IR(AS) ont été rappelées brièvement précédemment et le clonage du fragment de 309pb (antisens donné gracieusement par le Dr P. Brodt) a été cloné en orientation antisens de la même façon dans le site BglII, en configuration dicistronique avec la GFP. L'effet antisens a été mesuré dans un essai réalisé par co-transfection de la construction IGF-IR(S)/GFP et des antisens IGF-IR(AS)/GFP suivi d'une mesure de l'expression de la fluorescence émise par la GFP, 48h post-transfection (Figure 24-a). Les conditions de transfection ont été réalisées en variant la molarité de la construction sens co-transfectée versus la construction antisens. Des conditions équimolaires (1:1) ou des conditions telles que la concentration de l'antisens 309 est 10 fois plus importante que la construction sens (1:10) ont été réalisées. Des expériences contrôles, dans lesquelles les cellules 293A ont été transfectées seulement avec la construction IGF-IR/GFP ou co-transfectée avec un plasmide contrôle n'exprimant pas de fragment antisens (pTz) ont également été réalisées. La co-transfection du récepteur en orientation sens IGF-IR(S)/GFP et de la construction antisens IGF-IR(AS)/GFP réduit la fluorescence émise par la GFP d'environ 20 fois alors que la construction IGF-IR(AS)309/GFP entraîne une réduction d'environ 2 fois (dans des conditions équimolaires) par rapport aux cellules co-transfectées par le plasmide contrôle pTz dans les mêmes conditions. Dans des conditions où l'antisens IGF-IR(AS) 309 est exprimé 10 fois plus que le gène cible, une légère augmentation de la fluorescence émise par la GFP a été mesurée (par rapport à la transfection réalisée avec pTz dans des conditions 1:10) suggérant une inefficacité de cet antisens dans nos conditions expérimentales se traduisant par un effet additif de la fluorescence émise à la fois par la cible et par l'antisens transfecté. Il ne peut cependant pas être affirmé à cette étape, qu'une certaine partie des ARNm antisens arrivent quand même à s'hybrider à leur cible. En effet, les deux brins d'ARNm en configuration dicistronique avec la GFP vont s'hybrider au niveau de la séquence d'ARN complémentaire et cet ARNdb sera successivement reconnu et dégradé par la RNaseH cellulaire qui dégradera tout le complexe comprenant l'ARNm de la GFP. Une réduction dans la formation de protéine

GFP s'ensuit traduisant indirectement l'efficacité de l'ARN antisens qui s'est hybridé. Le problème apparaît lorsque le nombre de molécules d'ARN antisens est en excès par rapport au nombre de molécules d'ARN sens. Une partie de ces ARNs antisens vont s'hybrider mais les ARNs non-hybridés vont continuer à exprimer la GFP. Ainsi, une absence de réduction de la fluorescence GFP globale ne reflète pas alors forcément une inefficacité de la molécule testée en raison d'une part, d'un excès de molécules exprimant la GFP et d'autre part, de la demi-vie de la protéine GFP qui est d'environ 48h-72h (26). Afin de confirmer l'effet antisens mesuré indirectement par la fluorescence de la GFP, des lysats cellulaires ont été préparés et l'expression de IGF-IR analysée par Western-Blot (Figure 24-b). Comme le confirme la quantification de IGF-IR par densitométrie (Figure 24-c), l'antisens IGF-IR(AS)/GFP diminue d'environ 3 fois l'expression du transgène cible (chaîne β) alors que l'antisens IGF-IR(AS) 309/GFP entraîne une très légère diminution dans des conditions équimolaires. Dans ces conditions, les niveaux de réduction de l'expression du transgène IGF-IR obtenus par les antisens transfectés sont sous-estimés par rapport à leur effet sur l'expression du gène reporter GFP. Il est nécessaire de souligner que la mesure de l'efficacité antisens sur la forme mûre du récepteur IGF-IR conduit à une approximation quant à son efficacité réelle. En effet, un antisens peut affecter l'expression d'un gène à différents niveaux incluant la transcription, le traitement des pré-ARNm, le transport des ARNm et la stabilité des ARNs (65). Ainsi, l'AS pleine longueur semble avoir un effet antisens drastique sur les deux formes précurseurs exprimées alors que l'effet antisens mesuré sur la forme mûre est plus faible. La même observation a été faite avec l'AS 309 avec une efficacité moindre cependant.

Dans des conditions où l'antisens IGF-IR(AS)309/GFP est en concentration 10 fois supérieure au gène cible, une diminution de 1.5 fois de l'expression de la chaîne β de IGF-IR est notable et ne correspond pas à l'absence de diminution de la fluorescence de la GFP préalablement mesurée. Nous avons ainsi conclu que l'AS PL réduisait l'expression de IGF-IR avec une efficacité remarquable alors que l'AS 309 n'avait qu'un effet mineur. L'efficacité réelle de ces antisens dans des conditions équimolaires peut-être mesurée par l'expression de la GFP, l'analyse de l'expression de IGF-IR par Western-blot bien que conduisant à une sous-estimation de l'efficacité réelle de l'antisens permet néanmoins une vérification de l'efficacité des constructions testées.

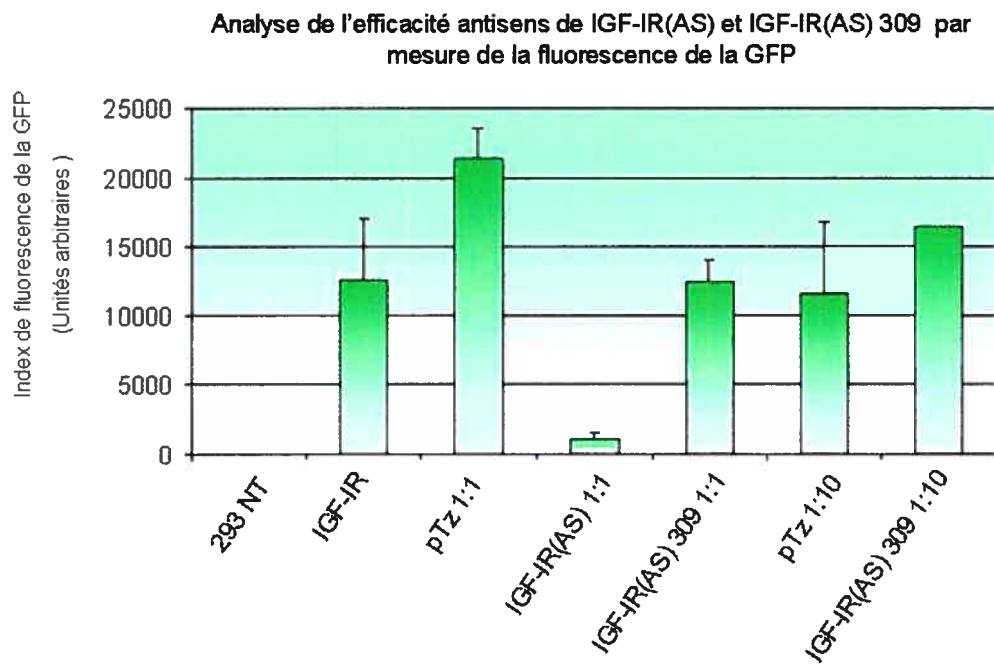


Figure 24 : Analyse de l'efficacité de constructions antisens sur l'expression du récepteur IGF-IR. Des cellules 293A ont été co-transfectées avec IGF-IR pAdIGF-IR(S) (dans chaque échantillon) et un plasmide contrôle (pTz) ou par le plasmide exprimant l'ADNc de IGF-IR en orientation antisens pAdIGF-IR(AS), ou par un fragment antisens de 309pb à IGF-IR, pAdIGF-IR(AS) 309. Le plasmide contrôle pTz n'exprime pas d'antisens et pas de gène rapporteur. Les ratios indiqués, 1:1 ou 1:10 indiquent la molarité entre le récepteur sens versus les constructions co-transfectées **a)** Analyse de l'expression de la GFP par cytométrie en flux. **b)** Analyse de l'expression de IGF-IR par immunobuvardage. Les cellules NIH 3T3 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression d'IGF-IR (une exposition plus longue est présentée) et les cellules 293A non transfectées (NT) comme contrôle de l'expression endogène du récepteur.

3-4 Construction d'une librairie de clones adénoviraux antisens à IGF-IR

Dans l'optique d'optimiser l'efficacité antisens des constructions AS (pleine longueur) et AS 309, nous avons généré une librairie adénovirale exprimant une grande diversité de variants antisens à IGF-IR. Sans revenir sur les détails de la construction de cette librairie, les étapes principales seront brièvement rappelées. À partir de la construction plasmidique exprimant IGF-IR en orientation antisens pAdIGF-IR(AS), une linéarisation de ce plasmide par l'enzyme de restriction BclI dont le site est placé au milieu du gène constituait le point de départ à une digestion bidirectionnelle par l'enzyme exonucléase III (ExoIII) (Figure 25). Toutes les 30 secondes, un aliquot de la réaction fut prélevé et la digestion enzymatique bloquée immédiatement. Ainsi, à chaque intervalle de temps, une mixture de fragments antisens à IGF-IR était prélevée. L'analyse de chaque aliquot sur gel d'agarose a permis de mettre en évidence une délétion d'environ 300pb toutes les 30 secondes. Le taux de digestion par l'ExoIII n'est parfois pas uniforme en raison probablement de structures secondaires dans l'ADN freinant la progression de l'enzyme. De plus; des effets directement liés à la migration peuvent expliquer que certains fragments (aux temps 11 et 12 pool*2) migrent moins loin. Le gène IGF-IR(AS) pleine longueur a une taille de 4.4kb et le plasmide pAdIGF-IR(AS) une taille de 13.3kb. Nous avons donc sélectionné seulement les aliquots dont la taille globale des plasmides analysés était supérieure à 8.9kb correspondant à une digestion totale du gène IGF-IR(AS). Une digestion trop importante par l'ExoIII entraîne la sélection de clones n'exprimant pas de fragments antisens diminuant ainsi la diversité de la librairie. Ainsi deux populations de plasmides adénovirus de transfert exprimant des variants antisens ont été formées : P*1 (du temps 1 à 7) dont les clones adénoviraux expriment des fragments antisens longs, P*2 (du temps 8 à 14) dont les clones adénovirus expriment des fragments antisens courts. Les adénovirus recombinants ont été ensuite créés par infection/transfection avec l'adénovirus parental et sélectionnés par la méthode de la sélection positive par complémentation du gène de la protéase (88) associée à une vérification de l'expression du gène reporter GFP. Environ 200 clones individuels ont été isolés et amplifiés. Environ 25 d'entre eux ont été choisis de façon aléatoire afin d'optimiser une méthode de criblage efficace de la librairie.

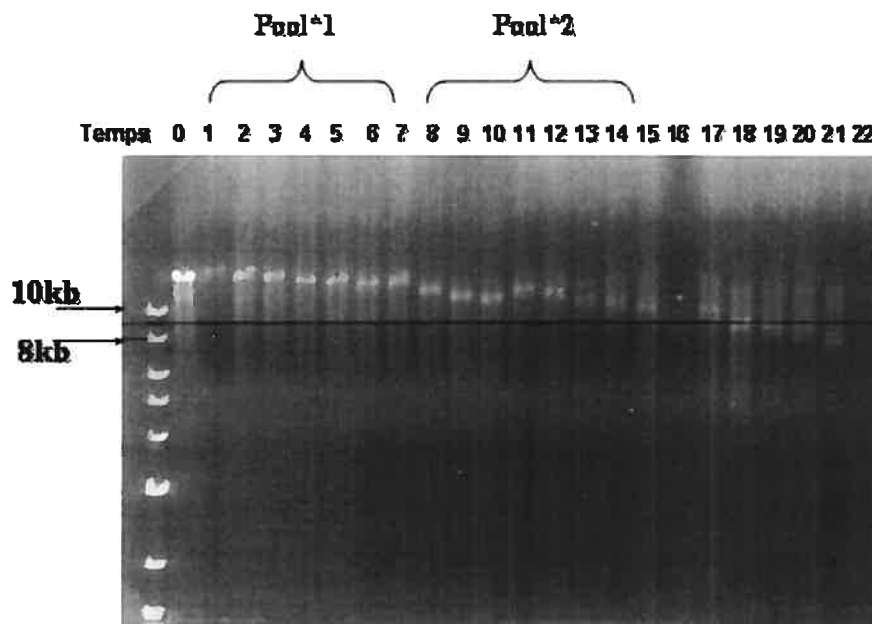


Figure 25: Génération des clones adénoviraux antisens par digestion bidirectionnelle du gène IGF-IR-AS PL par l'enzyme ExoIII. Après linéarisation du plasmide pAdIGF-IR(AS) par l'enzyme de restriction BclI (au temps 0), une digestion bidirectionnelle du gène IGF-IR(AS) a été réalisée. A chaque intervalle de temps (numérotés de 1 à 22) de 30 secondes, un aliquot de la réaction est prélevé et la digestion enzymatique arrêtée. Une analyse sur gel d'agarose a permis d'évaluer le taux de digestion de l'ExoIII à environ 300pb digérées toutes les 30 secondes et la formation de deux populations de variants antisens prêts à être utilisées pour former des adénovirus recombinants. Une population P*1 (du temps 1 à 7) dont les variants expriment des fragments antisens longs, et une population P*2 (du temps 8 à 14) dont les variants expriment des fragments antisens courts.

3-5 Essai d'optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle réplcatif

La lignée cellulaire 293CymRIGF-IR constitue un modèle attrayant pour le criblage préliminaire des différents clones adénovirus antisens. En effet, la possibilité de contrôler l'expression d'IGF-IR par un promoteur inductible et la possibilité de suivre son expression par son association au gène rapporteur GFP en configuration dicistronique font que nous avons choisi en premier lieu d'utiliser ce système de criblage. Les titres des clones adénovirus antisens sont approximatifs et ont été estimés à $5 \cdot 10^8$ ufp/mL à l'issu des amplifications successives (approximation possible en tenant compte qu'une cellule peut produire jusqu'à 1000 particules adénovirales infectieuses). Des cellules 293CymRIGF-IR ont d'abord été infectées à une m.o.i de 2 avec différents clones adénoviraux antisens suivi de l'induction de l'expression du transgène IGF-IR réalisée 18h post-infection. Ce délai a permis de favoriser l'accumulation d'ARN antisens dans la cellule. Une expérience contrôle a été réalisée de la même façon avec un virus exprimant la GFP en configuration dicistronique n'exprimant pas d'antisens (AdGFP). L'efficacité antisens des différents clones a été mesurée 36h post-infection à la fois par analyse de l'expression du gène rapporteur GFP et par une immunodétection de IGF-IR. IGF-IR a été détecté par deux types d'anticorps reconnaissant la chaîne α et β et par un anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine (PE) dont la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Une analyse de l'expression de la fluorescence de la GFP a été réalisée sur ces mêmes échantillons. L'analyse de la fluorescence totale émise par la PE a permis une classification des clones selon leur degré d'efficacité de réduction de l'expression d'IGF-IR (Figure 26-a). Les niveaux de réduction des différents antisens sont comparés à l'infection contrôle par AdGFP, infection qui entraîne une réduction d'environ 1.5 fois de l'expression du récepteur.

L'efficacité de réduction de l'expression d'IGF-IR mesurée varie d'environ 2.5 fois à aucune réduction significative mesurée. L'intensité de fluorescence de la PE mesurée pour le clone P2 AdASclone*1 est excessivement élevée (supérieure au niveau endogène) ainsi que la mesure de la fluorescence de la GFP pour ce même clone (Figure 26-b). Les longueurs d'onde d'émission de la GFP et de la PE se chevauchant en partie, il a été difficile d'effectuer la mesure réelle de la fluorescence émise par la PE et cette erreur était d'autant plus importante que l'intensité de la fluorescence GFP globale était élevée (Figure 26-b). Pour d'autres clones par exemple,

P1AdASclone*22, l'efficacité de réduction de l'expression de la PE correspondait également à une diminution de la GFP mesurée. L'évaluation de l'efficacité antisens par la mesure de la GFP est complexe dans ce système car, comme nous l'avons déjà souligné, l'annulation de la fluorescence émise par la GFP est liée à la concentration relative des brins sens et antisens et à la demi-vie de la protéine GFP. Il devient alors difficile dans un système répliatif d'analyser l'efficacité réelle de certains clones d'autant plus que certains d'entre eux entraînaient, après un laps de temps assez court, un effet cytopathique supérieur au contrôle AdGFP affectant la mesure réelle de l'effet antisens sur IGF-IR.

Ces difficultés d'analyse liées à l'utilisation d'un système de mesure de l'efficacité antisens trop complexe nous ont conduit à utiliser un autre système de criblage.

a)

Analyse par cytofluorométrie de l'efficacité antisens de différents clones adénoviraux antisens sur l'expression de IGF-IR

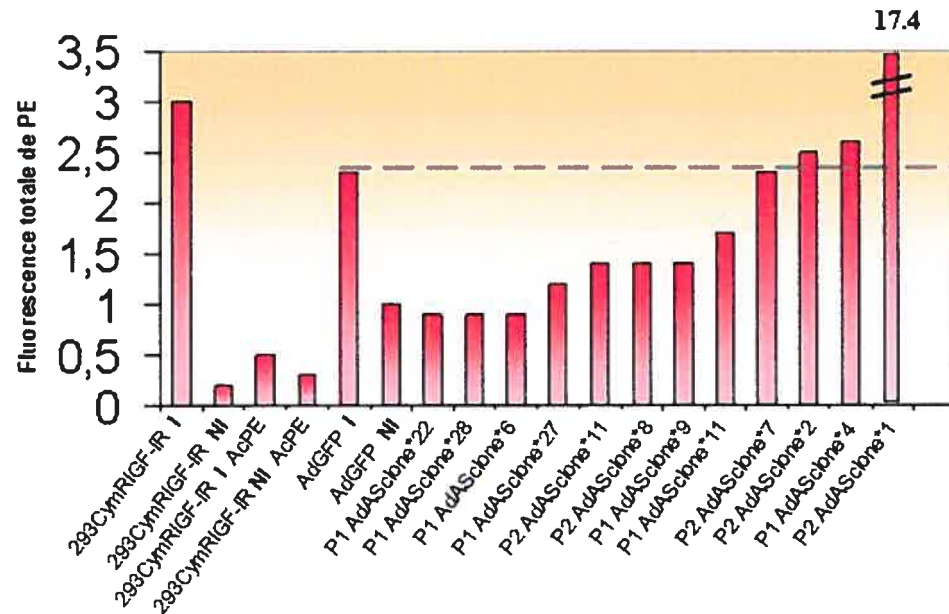
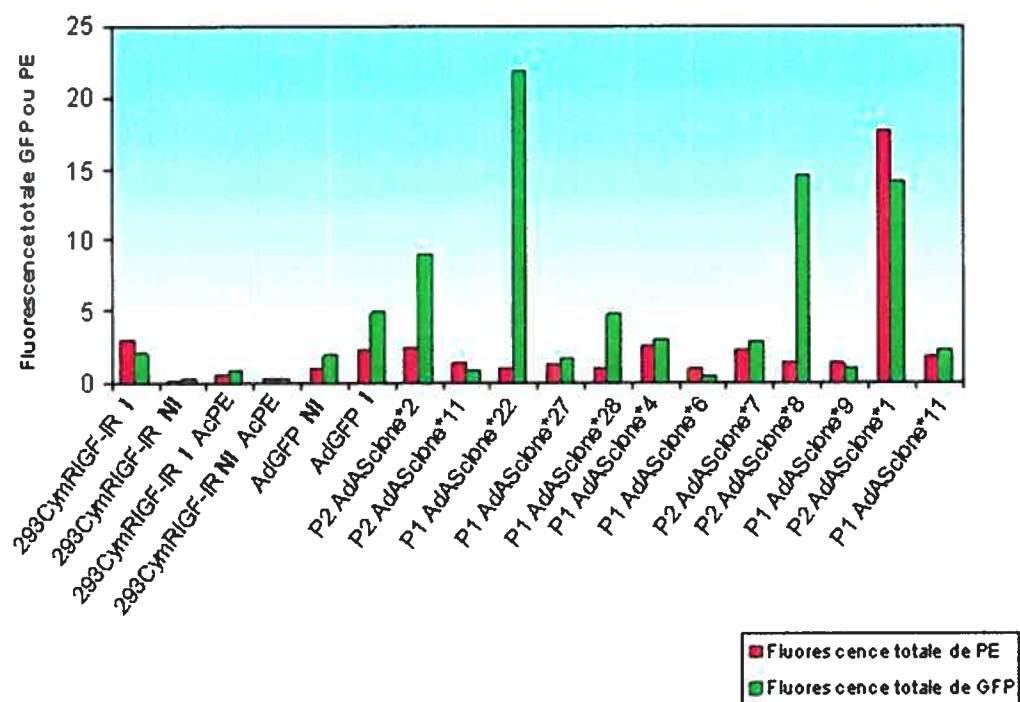


Figure 26: Optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle répliatif. Des cellules 293CymRIGF-IR ont été infectées ou par des clones adénovirus antisens (P1/P2 AdAS clone*) à une même m.o.i ou par un virus contrôle exprimant seulement la GFP en configuration dicistronique sans antisens (AdGFP). **a)** Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux après marquage indirect de IGF-IR par des anticorps spécifiques à la chaîne α et β du récepteur suivi d'un marquage secondaire par un anticorps couplé à la phycoerythrine (PE). **b)** Une mesure de la fluorescence de la GFP par cytométrie en flux a également été réalisée sur ces mêmes échantillons. Tous les échantillons sont marqués par un anticorps primaire dirigé contre IGF-IR suivi d'un marquage par un anticorps secondaire couplé à la PE. Les échantillons 293CymRIGF-IR I Ac-PE et 293CymRIGF-IR NI Ac-PE sont marqués uniquement avec l'anticorps secondaire anti-PE afin d'évaluer la spécificité de l'anticorps.

b)

Analyse de l'efficacité de différents clones adénoviraux antisens sur IGF-IR par immunocytochimie



3-6 Optimisation d'une méthode de criblage de clones adénovirus antisens à IGF-IR dans un modèle non-réplicatif.

Afin de s'affranchir des problèmes d'analyse de l'efficacité réelle des clones adénoviraux antisens dus en particulier à la complexité d'analyse de la fluorescence du gène rapporteur GFP et aux paramètres d'infection difficiles à établir, un autre modèle cellulaire dans lequel l'adénovirus ne peut plus se répliquer associé à une détection directe de IGF-IR a été utilisé. Les cellules HeLa ont été choisies en raison de leur capacité à être infectées facilement par l'adénovirus. Afin d'évaluer la multiplicité d'infection nécessaire pour infecter efficacement ces cellules, un test d'infectivité par un adénovirus « standard » exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur fort CMV5 (AdCMV5GFPq) fut réalisé. Le titre de cet adénovirus est connu et a été déterminé auparavant sur des cellules 293A par cytofluorométrie et par essai de plaques (1×10^{10} ufp/ml). Des cellules HeLa ont donc été infectées par des m.o.i croissantes de virus AdCMV5GFPq. 48h post-infection l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie en flux. Il a ainsi été possible de déterminer qu'une m.o.i d'environ 25 était nécessaire pour infecter 80% des cellules (Figure 27). Des cellules HeLa ont ensuite été infectées par chacun des clones adénovirus antisens en estimant la m.o.i d'infection à 25. Nous avons ainsi testé 23 clones par cette méthode, clones qui ont été choisis de façon aléatoire parmi les 200 clones de la librairie. La cinétique d'infection choisie dans cette expérience est la même que précédemment. L'infection précède l'expression d'IGF-IR (via la transfection du plasmide exprimant IGF-IR, pAdIGF-IR(S) afin de favoriser l'accumulation préalable de la construction antisens. Des expériences contrôles ont été réalisées en utilisant un adénovirus exprimant seulement la GFP en configuration dicistronique (AdGFP) dans des conditions où les cellules HeLa ont été par la suite transfectées ou non avec pAdIGF-IR. L'effet antisens de ces différents clones a été confirmé en analysant les lysats cellulaires par immunobuvardage afin d'évaluer les niveaux d'expression d'IGF-IR (Figure 28-a-c) suivi d'une quantification de l'intensité des bandes de IGF-IR afin de comparer l'efficacité antisens des clones adénoviraux testés (Figure 28-d). Tous les clones testés ont la capacité de réduire de façon efficace l'expression du transgène IGF-IR. Ces niveaux de réduction sont comparés au niveau d'expression d'IGF-IR après infection par le virus contrôle AdGFP. Les clones adénoviraux exprimant des antisens d'efficacité variables, trois zones de réduction ont été déterminées. Une zone A d'efficacité de

réduction de l'expression d'IGF-IR d'environ 10 fois, une zone B, qui est une zone médiane, regroupant la moitié des antisens réduisant l'expression de IGF-IR de 2 à 4 fois, et une zone C dont l'efficacité de réduction est égale et inférieure à 2 fois. Une expérience contrôle visant à comparer l'efficacité de l'antisens pleine longueur aux différents fragments antisens générés a été également réalisée. Le virus AdAS pleine longueur montre un potentiel de réduction de l'expression de IGF-IR allant jusqu'à 3 fois ce qui le classe parmi les antisens efficaces (Figure 28-d).

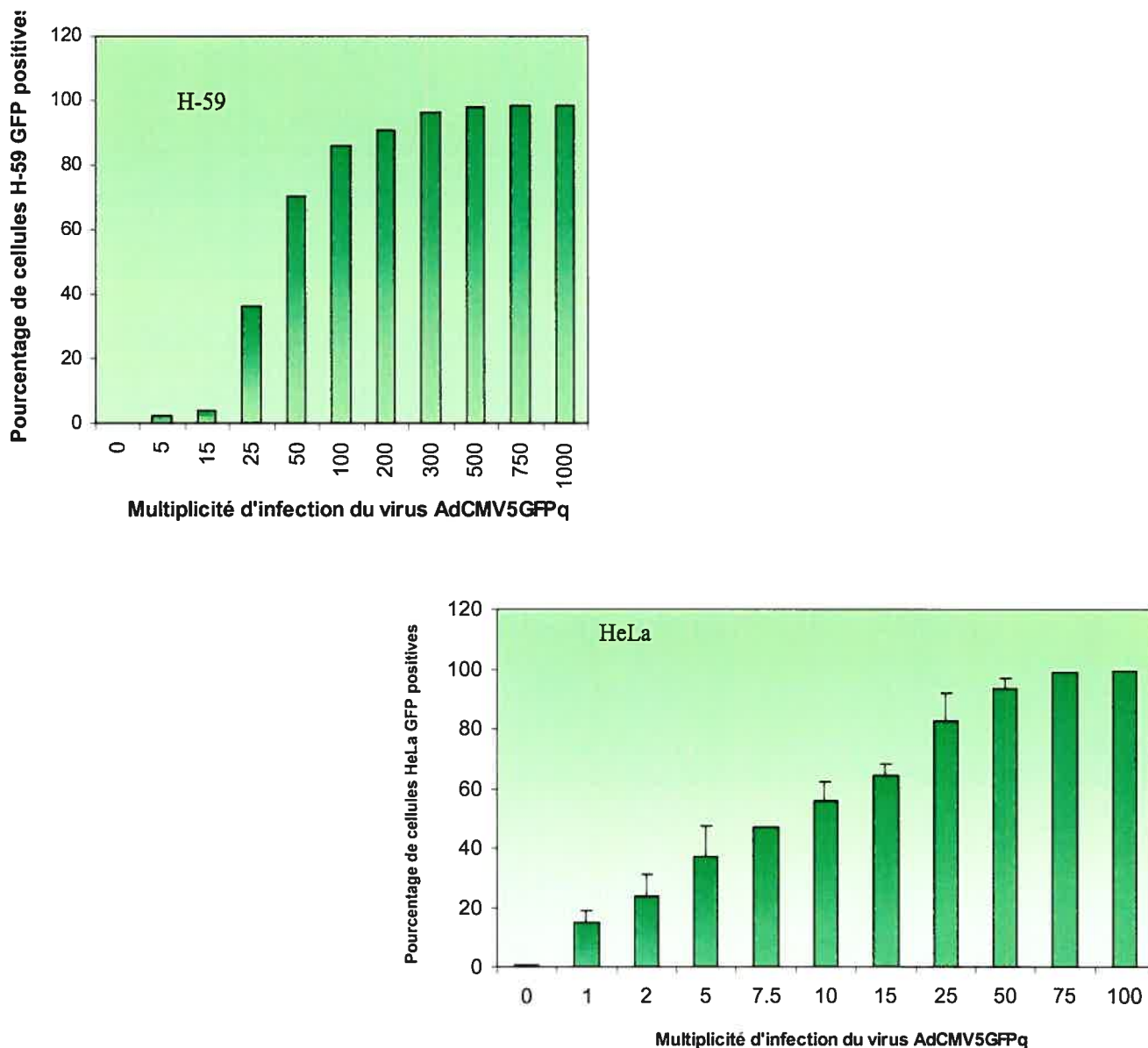


Figure 27: Évaluation de l'infektivité de AdCMV5GFPq dans des modèles cellulaires non-répliquatifs. Des cellules HeLa et H-59 ont été infectées avec des m.o.i croissantes de virus standard AdCMV5GFPq dont le titre est déterminé à 10^{10} ufp/mL. 48h après infection les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. La m.o.i à laquelle la population cellulaire est infectée à plus de 80% a été retenue pour la suite des expériences.

a)

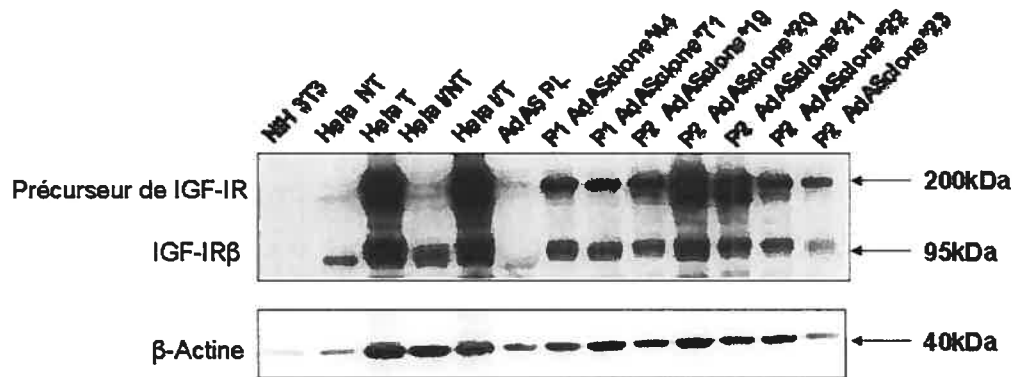
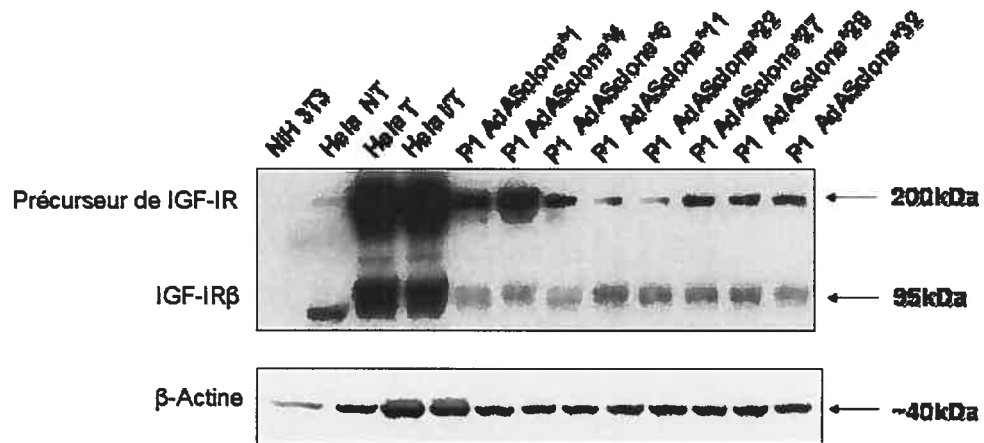
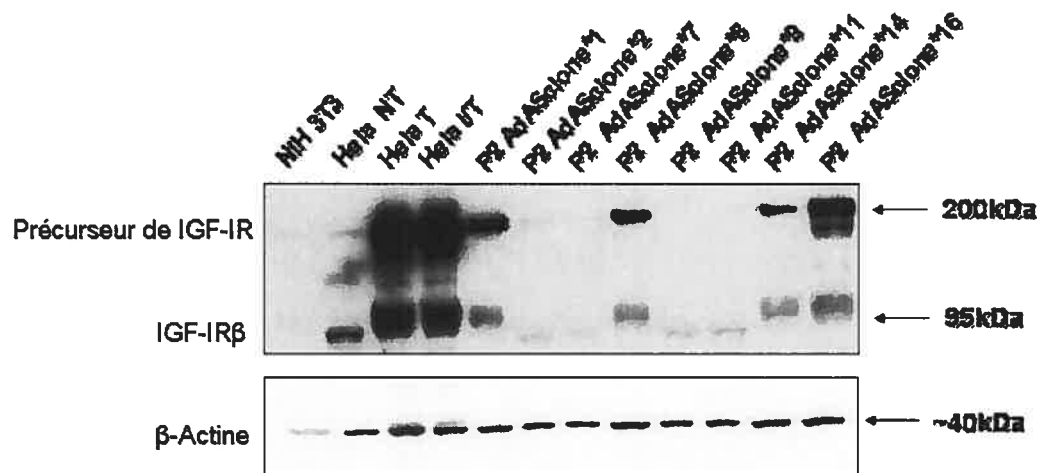


Figure 28 : Optimisation d'une méthode de criblage de la librairie dans un modèle non-réplicatif. a-c) Des cellules HeLa ont été infectées par des clones adénovirus antisens (P1/P2 AdAS clone*) ou par un virus contrôle exprimant seulement la GFP (HeLa I) à une même m.o.i. 24h post-infection ces cellules sont transfectées avec le plasmide pAdIGF-IR-S (HeLa T).48h post-infection, l'expression de IGF-IR est analysée par Immunobuvardage. Les cellules NIH3T3 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression d'IGF-1R, les cellules HeLa non transfectées (NT) comme contrôle de l'expression endogène du récepteur. **d)** Une analyse par densitométrie des immunobuvardages réalisés permet le classement des clones adénovirus antisens selon leur efficacité d'inhibition de l'expression de IGF-IR. Trois zones d'efficacité de réduction de l'expression du transgène ont été déterminées; zone A : réduction de 10 fois-, zone B : réduction de 2 à 4 fois, zone C : réduction de 2 fois et moins.

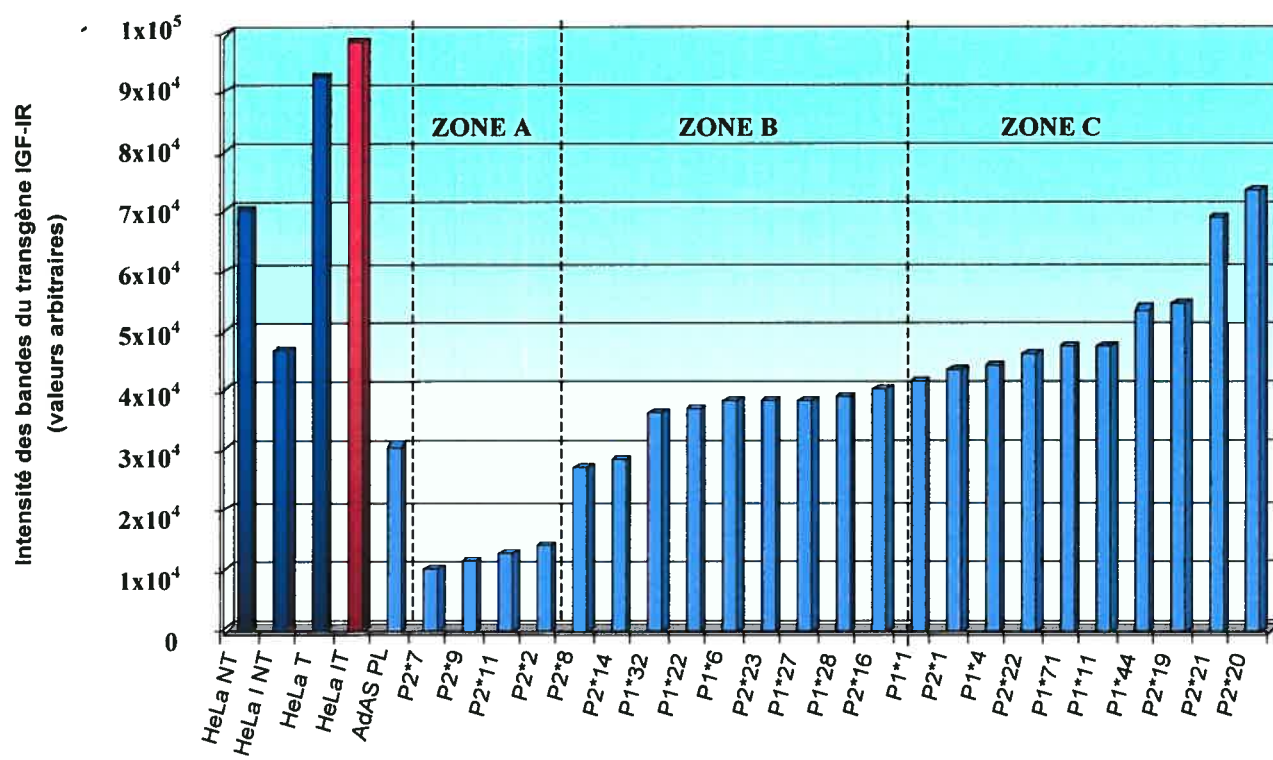
b)



c)



d)

Criblage de clones adénovirus antisens dans un modèle non-réplicatif

3-7 Criblage de shRNAs par mesure de l'efficacité du processus d'ARN interférence (ARNi) dans un système basé sur l'expression du gène rapporteur GFP.

Récemment, une autre stratégie a émergé afin d'inhiber l'expression du gène cible : l'ARN interférence (ARNi). Dans le modèle proposé dans les cellules de mammifères, des shRNAs exprimés par des promoteurs PolIII sont dégradés par une nucléase, la Dicer, en de petites molécules de 19-23nt, les siRNA, alors incorporés dans le complexe effecteur RISC qui permet la reconnaissance et la destruction de l'ARNm ciblé dans le cytoplasme (93).

Afin d'évaluer l'efficacité de cette stratégie en comparaison à l'utilisation d'ARN antisens, des plasmides exprimant quatre shRNAs distincts ont été générés ciblant IGF-IR et placés sous le contrôle du promoteur U6 humain. Les sites cibles des shRNAs hp1 et hp2 ont été choisis de manière aléatoire (24). Les hpC1 et hpC2 ont été utilisés comme des contrôles, leur efficacité ayant été démontrée dans une autre étude (11). Ces quatre shRNAs ont été clonés dans le plasmide pPCR2.1 (pPCRhp) selon la méthode décrite précédemment. L'efficacité du phénomène d'ARN interférence a été, dans une première approche, mesurée par co-transfection des plasmides pPCRhp individuellement dans des cellules 293A avec le plasmide rapporteur IGF-IR/GFP. Les conditions expérimentales ont été établies de telle sorte que la molarité entre le plasmide rapporteur IGF-IR/GFP et les pPCRhp soit identique (1:1) ou 10 fois plus importante pour les plasmides pPCR transfectés (1:10). La même expérience est réalisée avec le plasmide contrôle pTz co-transfecté avec le transgène IGF-IR/GFP. Afin d'évaluer l'efficacité des shRNAs, la fluorescence de la GFP a d'abord été mesurée par cytométrie en flux (Figure 29-a). En parallèle, l'expression d'IGF-IR fut analysée par Immunobuvardage. (Figures 29-b-c). Le hp2 réduit la fluorescence de la GFP d'environ 4 fois en comparaison à la mesure de la fluorescence de la GFP obtenue lors de la transfection du plasmide contrôle pTz dans des conditions équimolaires. Son efficacité de réduction est encore plus importante (réduction d'environ 10 fois) lorsqu'il est en concentration 10 fois plus importante que le transgène IGF-IR/GFP. Le hp1 ne réduit pas l'expression de la GFP ainsi que hpC1 alors que hpC2 entraînent une légère réduction (d'environ 1.5 fois) dans des conditions équimolaires. Lorsque la concentration des shRNAs fut augmentée de 10 fois par rapport au transgène, seul le

hp2 a montré une efficacité plus importante (réduction de la fluorescence GFP d'environ 8 fois) alors que les autres shRNAs n'entraînaient toujours pas de réduction significative.

La réduction observée au niveau de la fluorescence de la GFP corrèle avec les effets de ces shRNAs sur l'expression du transgène IGF-IR. En effet, la forte réduction de la fluorescence de la GFP par le hp2 correspond à une réduction drastique de l'expression de IGF-IR, réduction d'environ 7 fois dans des conditions équimolaires et presque totale lorsqu'il est surexprimé par rapport au transgène IGF-IR/GFP. Pour les autres shRNAs, aucune réduction significative du transgène n'a été constatée dans des conditions équimolaires alors qu'une diminution d'environ deux fois fut obtenue lorsque hp1, hpC1 et hpC2 étaient surexprimés.

Afin de vérifier la spécificité des shRNAs, ceux-ci ont été co-transfectés avec le transgène DsRed. Le niveau d'expression de cette protéine ne devrait pas être affecté par les shRNAs. Les conditions expérimentales sont identiques à celles réalisées avec le transgène IGF-IR/GFP. Il semblerait que le niveau d'expression de la DsRed soit diminué légèrement (d'environ 1.5 fois) dans des conditions 1:1 ou 1:10 avec le hpC2. Nous avons observé également que le niveau d'expression de la DsRed pouvait être affecté (augmentation de l'expression de la DsRed jusqu'à deux fois) avec le hp2 dans des conditions 1:10. L'analyse de l'efficacité des shRNAs sur l'expression d'IGF-IR doit donc tenir compte de ces effets non-spécifiques.

Il est important de souligner que ces différences pourraient être dues à des variations de l'efficacité de transfection. La plupart des expériences ont été réalisées en duplicata.

a)

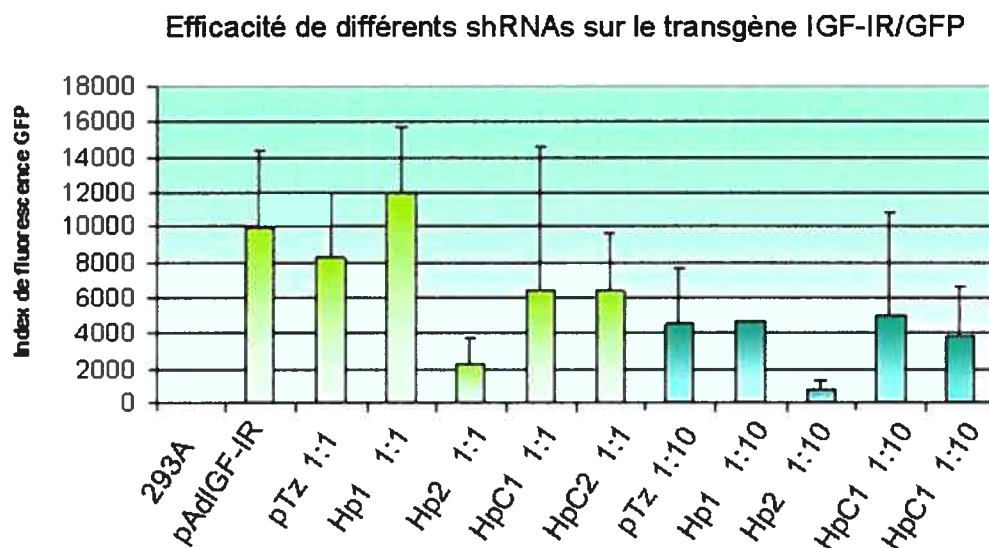
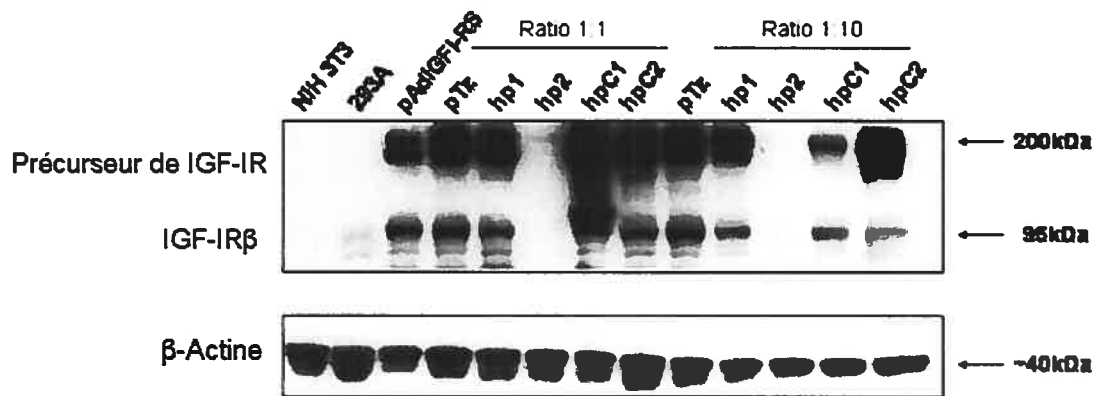
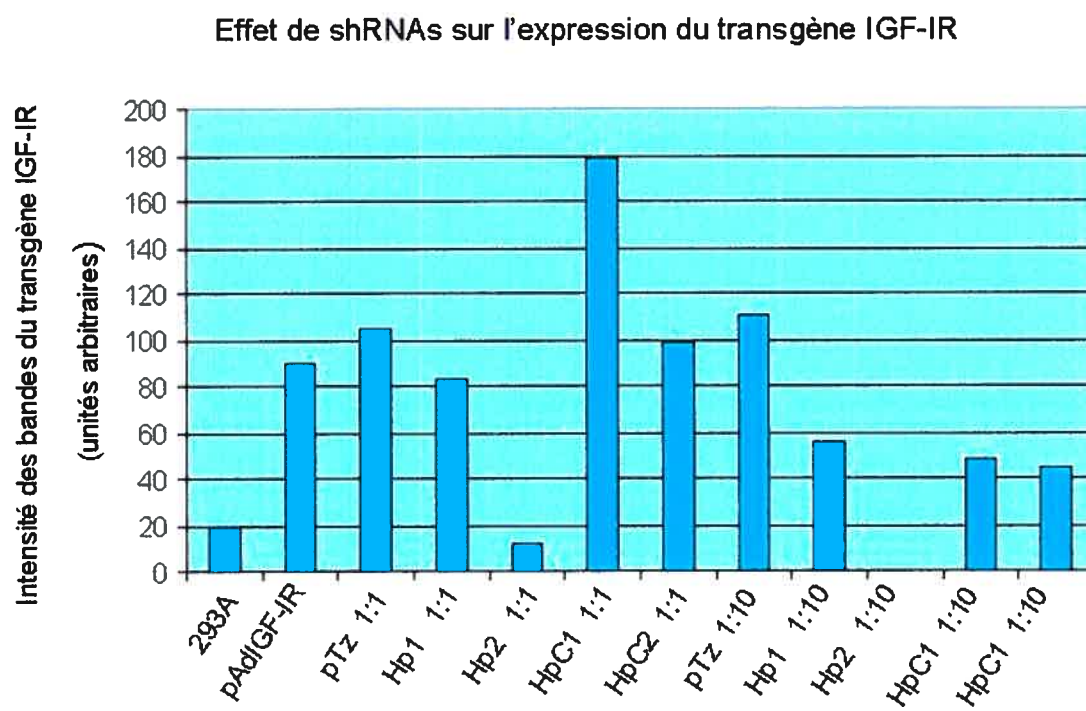


Figure 29 : Effet de différents shRNAs sur le transgène IGF-IR/GFP. Des cellules 293A ont été co-transfectées par le plasmide pAdIGF-IR(S) seul, avec un plasmide contrôle pTz ou avec différents shRNAs (hp1, hp2, hpC1 ou hpC2). Les ratios indiqués, 1:1 ou 1:10 indiquent la molarité entre le récepteur IGF-IR et la construction co-transfectée. **a)** Analyse de l'expression de la GFP par cytométrie en flux. **b)** Analyse de l'expression de IGF-IR par immunobuvardage. Les cellules NIH3T3 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression d'IGF-IR et les cellules 293A non transfectées comme contrôle de l'expression endogène du récepteur. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits. **c)** Analyse par densitométrie de l'effet de shRNAs sur l'expression du transgène IGF-IR. **d)** Vérification de la spécificité des différents shRNAs par co-transfection transitoire du transgène DsRed et des différents shRNAs. La transfection est réalisée dans les mêmes conditions que pour le transgène IGF-IR/GFP.

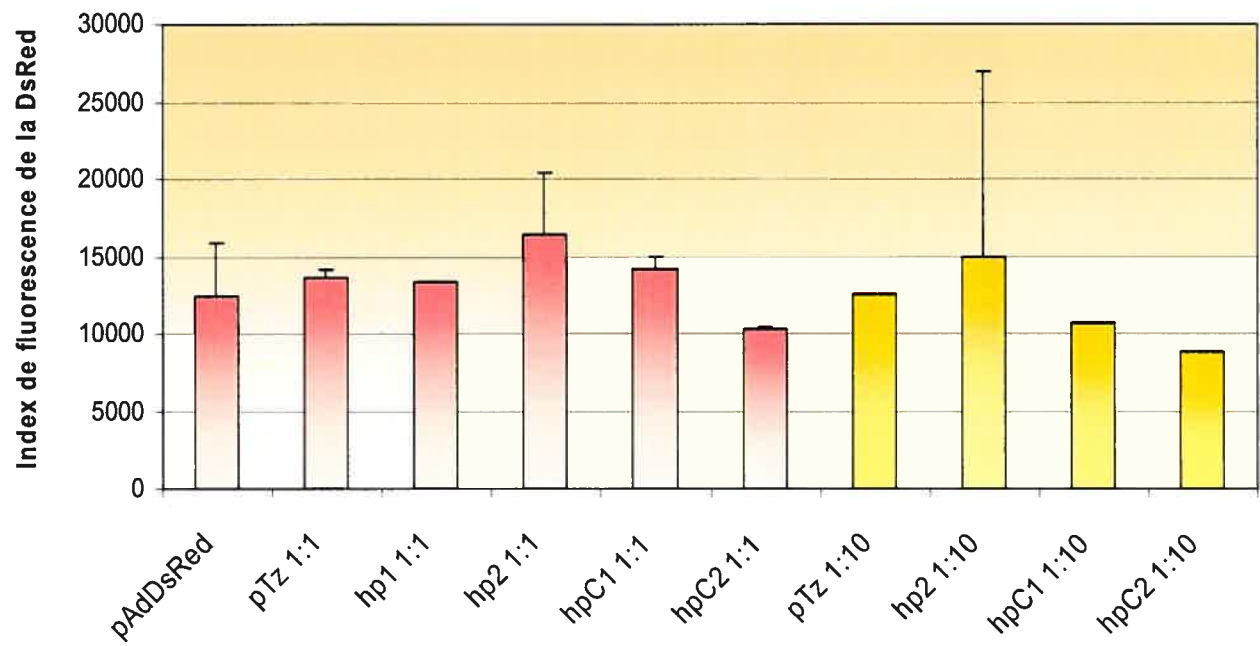
b)



c)



d)

Effet des shRNAs sur le transgène DsRed

3-8 Efficacité du hp2 livré par un vecteur adénoviral

Afin de s'affranchir des limitations liées à la transfection et dans le but de vérifier si l'efficacité du hp2 était liée au vecteur d'expression utilisé, la cassette d'expression U6 hp2 fut également clonée dans le vecteur adénoviral de transfert pAd-DsRed2N1-MLP-PS au niveau du site unique XbaI comme il fut décrit précédemment.

Une vérification préalable de la fonctionnalité du hp2 dans le vecteur adénovirus de transfert (pAdhp2) fut réalisée. Des cellules 293A ont été co-transfectées avec le plasmide pAdIGF-IR(S) et un plasmide contrôle (pTz) ou avec pAdhp2 dans des conditions équimolaires. L'expression d'IGF-IR fut analysée par immunobuvardage (Figure 30). La co-transfection avec pAdhp2 entraînait une réduction de l'expression d'IGF-IR presque totale. La fonctionnalité du hp2 ainsi que son efficacité dans ce vecteur de transfert ont donc été préalablement vérifiées. Les adénovirus recombinants ont été formés après transfection des vecteurs de transfert linéarisés par l'enzyme PacI et infection par un virus parental n'exprimant pas le gène de la protéase. La sélection des adénovirus recombinants a été facilitée par la présence des gènes rapporteur DsRed.. Des cellules 293CymRIGF-IR ont été infectées avec des m.o.i croissantes de virus n'excédant pas une m.o.i de 5 afin de minimiser l'effet cytopathique, le virus étant capable de se répliquer dans ces cellules. L'expression de IGF-IR fut induite par le cumate 24h après infection et analysée par immunobuvardage 48h après infection (Figure 31 a-b) Au niveau du virus contrôle exprimant seulement la DsRed, l'expression de IGF-IR a diminué d'environ 2 à 3 fois (réduction significative à partir d'une m.o.i de 1). La diminution graduelle de l'expression d'IGF-IR est due à des effets non spécifiques dus à l'augmentation de l'effet cytopathique lors de m.o.i croissantes entraînant un arrêt de la synthèse de nombreux gènes cellulaires. L'infection des 293CymRIGF-IR avec le virus Adhp2 aboutit à une réduction de l'expression d'IGF-IR très importante à partir d'une m.o.i de 1 et presque totale à une m.o.i de 5 alors qu'aux mêmes m.o.i, la réduction entraînée par AdDsRed était beaucoup moins importante. Nous avons conclu que le hp2 réduisait avec efficacité l'expression du transgène IGF-IR lorsqu'il était exprimé par un vecteur adénoviral.

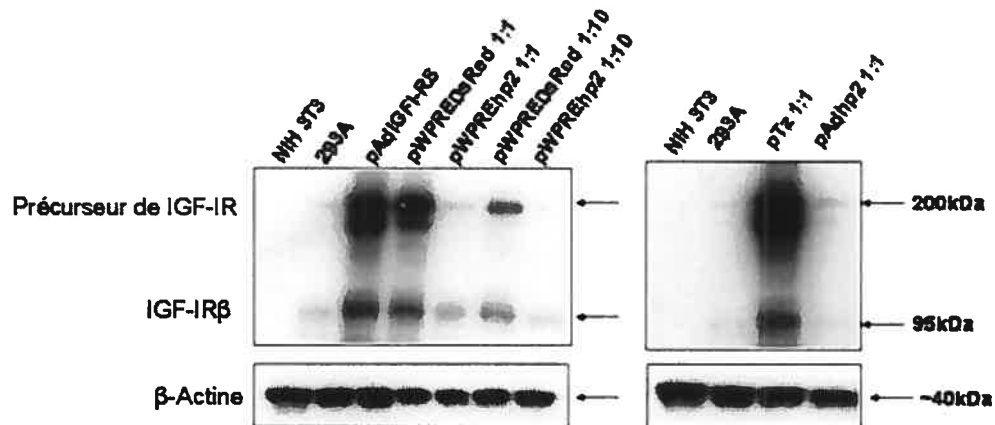


Figure 30 Validation du clonage du shRNA hp2 dans les vecteurs adénovirus et lentivirus.

Des cellules 293A ont été co-transfectées avec le plasmide pAdIGF-IR(S) seul ou avec le plasmide lentiviral sans le hp2 (pWPREDsRed) ou avec ce même plasmide contenant le hp2 (pWPREDhp2). De la même façon, les cellules 293A ont aussi été co-transfectées avec le plasmide pAdIGF-IR(S) et pTz ou avec le plasmide adénoviral contenant le hp2. Les ratios indiqués, 1:1 ou 1:10 indiquent la molarité entre pAdIGF-IR et pAdIGF-IR(S) et la construction co-transfectée. Une analyse de l'expression d'IGF-IR a été réalisée par immunobuvardage. Un anticorps reconnaissant à la fois la forme précurseur d'IGF-IR (200kDa) et la chaîne β (95kDa) a été utilisé. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits.

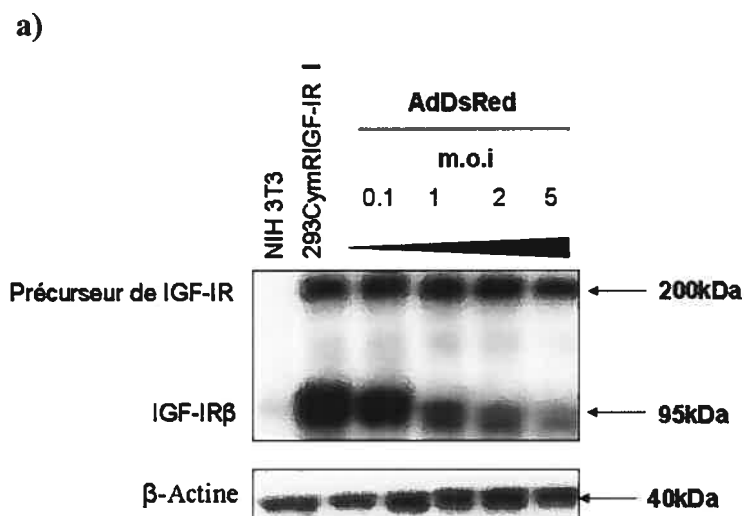
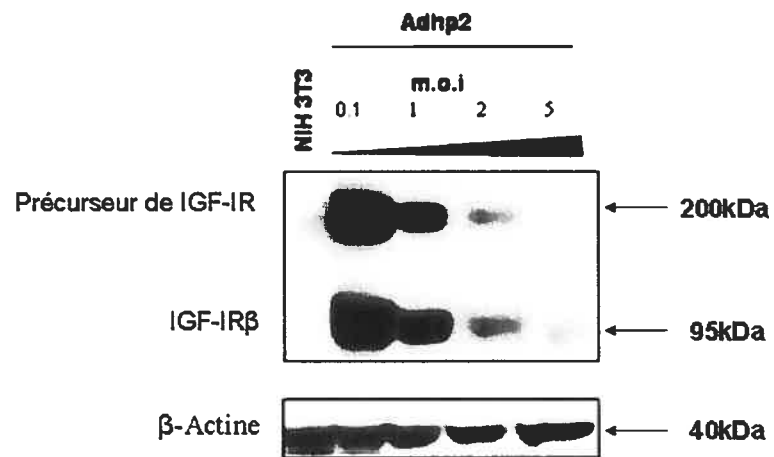


Figure 31a)-b) Effet du hp2 livré par un vecteur adénoviral sur le transgène IGF-IR. Des cellules de la lignée 293CymRIGF-IR ont été infectées par deux adénovirus recombinants exprimant seulement la DsRed (AdDsRed) ou la DsRed et le hp2 (Adhp2). Les infections ont été réalisées avec des m.o.i croissantes de virus : 0.1, 1, 2, 5. 24h après infection l'expression de IGF-IR a été induite (I) par du cumate. 48h post-infection, les cellules sont lysées et l'expression d'IGF-IR analysée par immunobuvardage. Les cellules NIH 3T3 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression d'IGF-IR ainsi que les cellules 293CymRIGF-IR non infectées induites (I) par le cumate. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits.

b)



3-9 Effet du hp2 livré par un vecteur lentiviral sur l'expression d'IGF-IR.

Afin d'optimiser l'efficacité du hp2, un autre vecteur viral fut utilisé. La cassette d'expression U6-hp2 fut clonée dans le vecteur lentiviral de transfert pRRL.cPPTCMV5DsRed2-N1-WPRE (pWPREhp2). Afin de vérifier l'efficacité du hp2 dans ce vecteur lentiviral, des cellules 293A furent cotransfectées par pAdIGF-IR(S) et le plasmide de transfert lentiviral n'exprimant pas le hp2 (pWPREDsRed) ou par ce même plasmide exprimant le hp2 (pWPREhp2). L'analyse de l'expression d'IGF-IR fut réalisée par immunobuvardage (Figure 30). Une réduction importante de l'expression d'IGF-IR est constatée dans des conditions équimolaires ou dans des conditions où le hp2 était surexprimé. Nous avons donc confirmé l'efficacité de réduction d'IGF-IR par le hp2 lorsque celui-ci était livré par ce vecteur lentiviral. Les lentivirus recombinants exprimant le hp2 (LVhp2) ont été générés après transfection de la lignée cellulaire 293SF-Pac LV par le plasmide pWPREhp2. Des cellules 293CymRIGF-IR ainsi que des cellules H-59 ont subi deux transductions successives (T1 et T2) de lentivirus recombinant exprimant seulement la DsRed (LVDsRed) ou exprimant la DsRed et le hp2 (LVhp2). Les différentes populations cellulaires obtenues à l'issue de ces transductions ont été analysées par cytométrie en flux afin d'évaluer l'efficacité de transduction grâce au gène rapporteur DsRed (Figure 32-a) et visualisées en microscopie et fluorescence afin de vérifier l'expression du gène rapporteur DsRed (Figure 32-c). La deuxième transduction, dans la lignée 293CymRIGF-IR, aussi bien après transduction par le LVDsRed contrôle que par le LVhp2, permet d'augmenter le signal de fluorescence émis par la DsRed traduisant un enrichissement en nombre de copies du génome lentiviral dans ces cellules. Une deuxième transduction des cellules H-59 n'a pas eu l'effet attendu, puisque l'index de fluorescence de la DsRed a diminué de 4 fois après transduction par LVDsRed et de 10 fois par LVhp2. En outre, l'efficacité de transduction est plus importante avec LVDsRed qu'avec LVhp2 et ce, dans les deux lignées; efficacité 6 fois supérieure avec LVDsRed vs LVhp2 dans les 293CymRIGF-IR, et 2 fois supérieure dans les H-59 (après une deuxième transduction). Les stocks de virus LVDsRed devaient être plus concentrés que les stocks de LVhp2 à l'issue de la production dans les cellules 293.

Afin de surpasser le problème d'une transduction peu efficace, les cellules exprimant la DsRed dans la population cellulaire 293CymRIGF-IR transduites avec LVhp2 (T2 pool LVhp2) furent clonées (par le Quixell) et amplifiées.

Six clones furent analysés par cytométrie en flux afin d'évaluer la fluorescence émise par la DsRed (Figure 32-a). Afin de vérifier s'il existait une corrélation entre le niveau de fluorescence de la DsRed et le niveau d'expression du hp2, l'expression de IGF-IR fut induite et les lysats cellulaires de chaque clone ainsi que des différentes populations cellulaires analysées par immunobuvardage (Figure 32 b). L'analyse des six clones a montré une diminution des niveaux d'expression de IGF-IR variable et une diminution très importante observée dans le clone *3. Au niveau de la population 293CymRIGF-IR transduite par le LVhp2, aucune diminution de l'expression d'IGF-IR n'a été mesurable. Ceci s'explique par une efficacité de transduction de seulement 20% des cellules d'autant plus que dans chacune de ces cellules transduites, la diminution de IGF-IR n'est pas totale comme le démontre l'analyse des six clones. Une diminution d'IGF-IR aurait été mesurable si l'efficacité de transduction avait été efficace. D'autre part, il n'a pas été constaté de relation évidente entre le niveau de fluorescence de la DsRed mesuré et le degré de réduction d'IGF-IR.

Il serait néanmoins nécessaire de s'assurer que la réduction d'IGF-IR observée est bien due à l'expression du hp2 et non à la sélection de clones exprimant moins le récepteur.

a)

Analyse par cytométrie en flux de populations cellulaires transduites par un vecteur lentiviral exprimant un shRNA

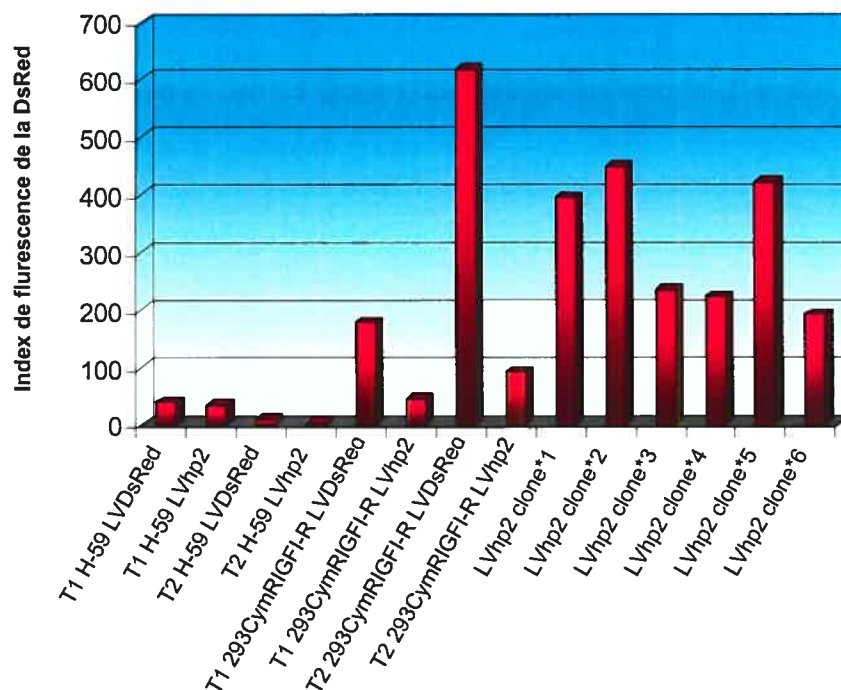


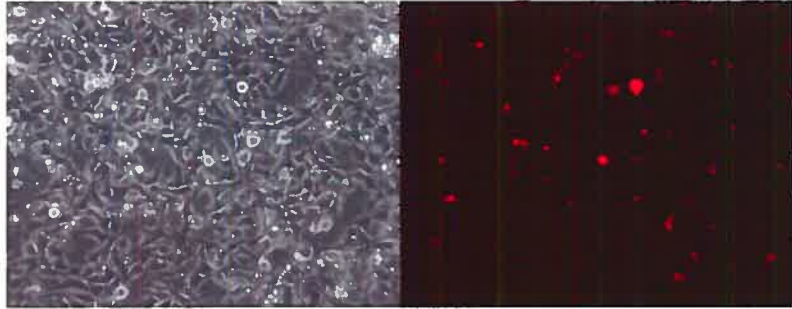
Figure 32 Effet du hp2 livré par un vecteur lentiviral sur l'expression de IGF-IR. Les cellules 293CymRIGF-IR ou H-59 ont été transduites par un lentivirus co-exprimant la DsRed et le hp2 (LVhp2) ou par ce même lentivirus n'exprimant pas le hp2 (LVDsRed). Six clones dérivés de la population cellulaire 293CymRIGF-IR transduite par LVhp2 ont été analysés ainsi que les populations cellulaires en conditions induites (I) ou non-induites (NI) au cumate. **a)** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la DsRed des différentes populations cellulaires à la suite de deux rondes de transductions (T1/T2) ainsi que des populations clonales. **b)** Analyse de l'expression de IGF-IR par Immunobuvardage. Les cellules NIH 3T3 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de IGF-IR ainsi que les cellules 293CymRIGF-IR non-transduites. La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits **c)** Visualisation du gène rapporteur DsRed à l'issue de la deuxième ronde de transduction des cellules 293CymRIGF-IR et H-59.

c)

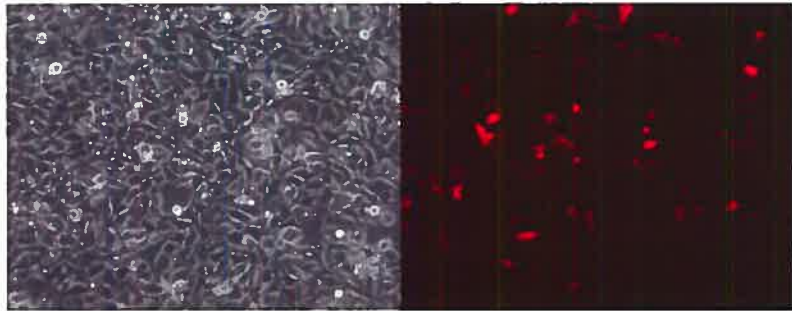
Contraste de phase

Fluorescence

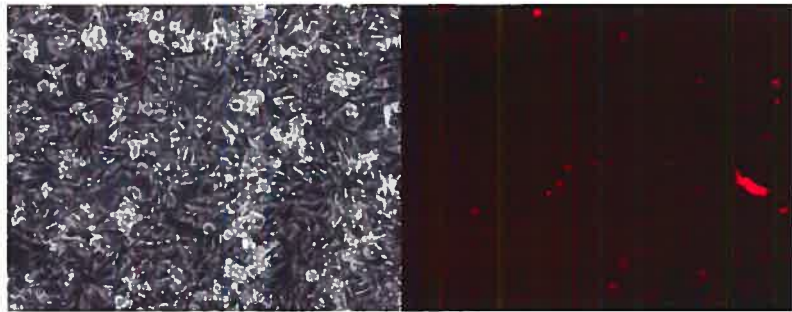
**T2 pool 293CymRIGF-IR
LVDsRed**



**T2 pool 293CymRIGF-IR
LVhp2**



**T2 Pool H-59
LVDsRed**



**T2 Pool H-59
LVhp2**



3-10 Analyse de l'efficacité du hp2 et de constructions antisens sélectionnées, livrés par un adénovirus sur l'expression d'IGF-IR endogène

Afin de confirmer l'efficacité du hp2 ainsi que des différents antisens sélectionnés précédemment, une analyse de leur capacité à réduire l'expression d'IGF-IR endogène fut réalisée. Les lignées cellulaires que nous avons choisies d'utiliser sont les lignées murines H-59 et les JMO1. Les H-59, car elles ont déjà été utilisées auparavant dans le même type d'expérience et les JM01 pour leur plus grande infectivité. Un test d'infectivité des cellules H-59 a également permis de déterminer qu'une m.o.i de 100 permettait d'infecter plus de 80% des cellules (Figure 27). En ce qui concerne les JM01, ce même test n'a pas été réalisé mais une m.o.i d'environ 100 est connue comme étant suffisante pour infecter la grande majorité des cellules (donnée communiquée). Toujours dans l'objectif d'optimiser une méthode de criblage à haut débit permettant l'identification préliminaire de clones efficaces, les titres de centaines de clones ne peuvent être titrés en premier lieu avec précision. C'est pourquoi les titres de 24 clones adénoviraux antisens furent estimés comme précédemment à 5×10^8 ufp/mL

(approximation possible en prenant en compte qu'une cellule peut produire jusqu'à 1000 particules virales infectieuses). Les deux types cellulaires, H-59 et JM01 ont été infectés à une m.o.i de 100 par les différents clones adénovirus exprimant des antisens d'efficacités variables préalablement sélectionnés à l'issue du criblage sur les cellules HeLa. Deux clones adénovirus antisens de chacune des trois zones de réduction de l'expression du transgène IGF-IR ont été utilisés (Figure 28-d). Le virus AdIGF-IR-AS pleine longueur et AdIGF-IR(AS) 309 ont été préalablement titrés afin d'évaluer également leur efficacité sur l'expression de IGF-IR endogène. Le titre d'AdIGF-IR AS pleine longueur étant de 3.3×10^7 ufp/mL, il aurait été nécessaire, pour infecter les cellules à la même m.o.i que les autres clones, que le volume d'infection soit 10 fois supérieur. Nous n'avons pu, dans les délais impartis, concentrer ce virus. C'est pourquoi l'efficacité de la construction AS pleine longueur sur l'expression de IGF-IR endogène est sous-estimée dans cette expérience. Les expériences contrôles ont été réalisées en utilisant un adénovirus exprimant seulement la DsRed sans le hp2 (AdDsRed) et un adénovirus exprimant seulement la GFP sans antisens en configuration dicistronique

(AdGFP). L'efficacité d'inhibition de l'expression de IGF-IR a été confirmée par immunobuvardage (Figure 33 a-b). En ce qui concerne le hp2, celui-ci réduit l'expression de IGF-IR d'environ 2.5 fois dans les JMO1 et 3.5 fois dans les H-59, niveaux de réduction calculés par rapport aux cellules infectées par le virus contrôle AdDsRed (Figure 33 a et b). Les clones P2AdASclone*7 et P1AdASclone*6 n'avaient aucun effet antisens significatif sur IGF-IR endogène alors que ces mêmes clones étaient efficaces sur le transgène (Figure 28-d, zone de réduction A et B respectivement). Les autres clones montrent une efficacité de réduction de l'expression du récepteur endogène allant jusqu'à 3 fois suivant le type cellulaire.

L'efficacité de réduction de l'expression de IGF-IR endogène par les antisens AS pleine longueur et AS 309 a également été analysée. Aucune réduction significative du niveau de récepteur n'a été observée dans les H-59 et dans les JMO1 suite à une infection par AdIGF-IR-AS 309. Par contre, une réduction de deux fois de IGF-IR est observée dans les JMO1 par AdIGF-IR(AS) pleine longueur, réduction moins importante dans les H-59. Il est difficile ici d'évaluer l'efficacité réelle de l'antisens AS pleine longueur en raison d'une infection de plus faible efficacité (d'un facteur 10 environ) par rapport aux autres virus comme mentionné précédemment.

Des molécules d'ARNdb dans le cytoplasme de cellules mammifères peuvent conduire à une suppression non spécifique de l'expression des gènes par l'activation de la voie de l'enzyme PKR. La PKR ainsi activée va alors phosphoryler un certain nombre de substrats incluant le facteur eIF-2 α conduisant à une inhibition générale de la synthèse protéique. Par conséquent, en parallèle à nos analyses de l'expression du récepteur IGF-IR endogène, nous avons réalisé une immunodétection de eIF-2 α phosphorylé (P*-eIF-2 α) afin de déterminer comment l'activation de la PKR pouvait contribuer à l'effet antisens mesuré.

Dans les H-59, l'infection adénovirale (par un virus contrôle AdDsRed ou Ad GFP) semble provoquer une augmentation du niveau de P*-eIF-2 α importante, de l'ordre de 2 à 2.5 fois. (Figure 33-b) Cette même infection réalisée sur les cellules JMO1 n'entraîne pas de variation significative du niveau de P*-eIF-2 α (Figure 33-a). Pour les JMO1 la quantification de P*-eIF-2 α n'a pu être présentée en raison de la moins bonne qualité du Immunobuvardage. Les variations du niveau de P*-eIF-2 α par les différents antisens et par le hp2 sont évaluées par rapport au niveau de phosphorylation de ce facteur induit lors des infections par les virus

contrôles. Ainsi, le hp2 n'entraîne pas une augmentation significative de P*-eIF-2 α . Parmi les constructions antisens analysées, seule la construction AS pleine longueur provoque une augmentation notable du niveau de P*-eIF-2 α dans les deux types cellulaires d'environ 1.5 fois. Ainsi, le potentiel antisens observé pourrait être dû en partie à l'inhibition non- spécifique de la synthèse protéique. Les autres antisens n'entraînaient pas d'augmentation de P*- eIF-2 α .

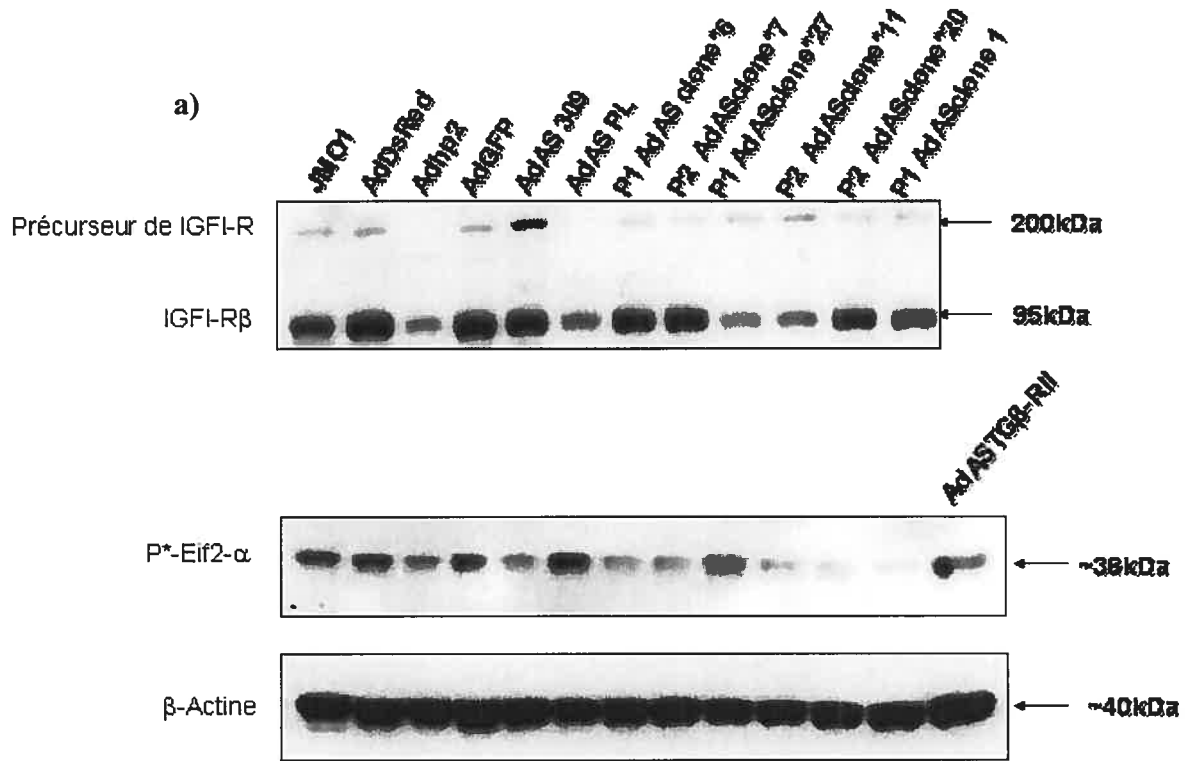
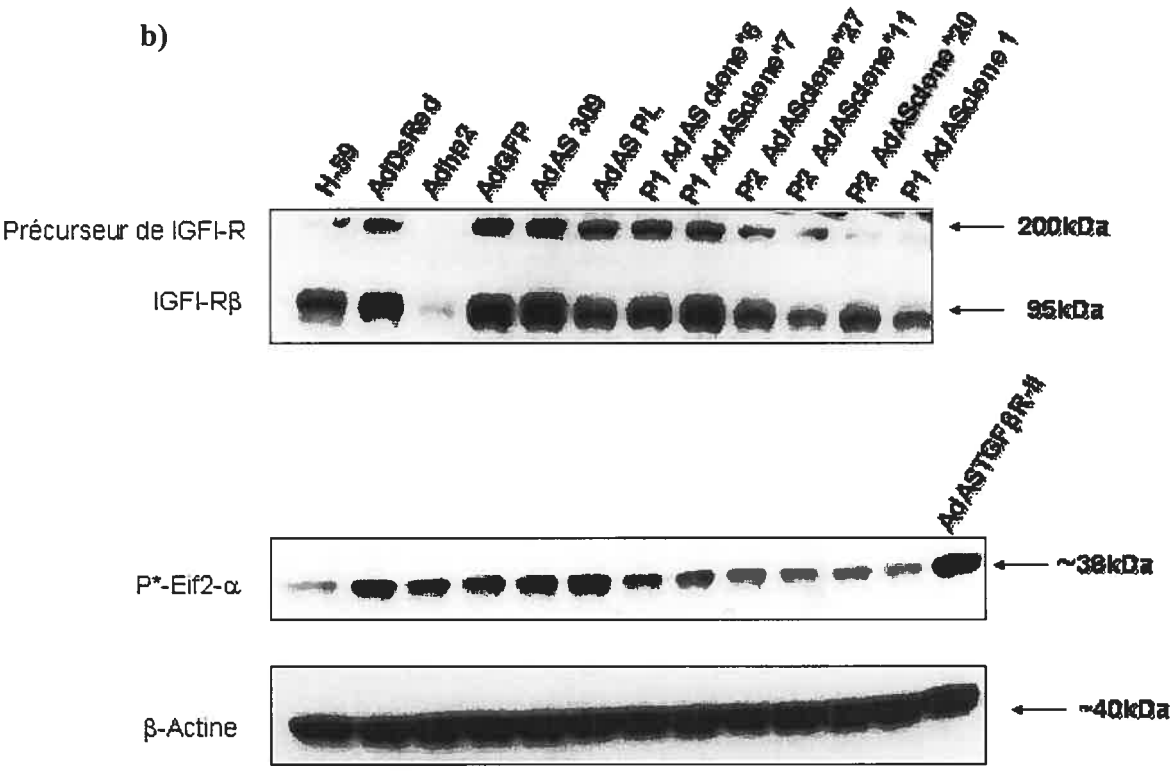


Figure 33 Efficacité du hp2 et des constructions antisens sélectionnées sur l'expression de IGF-IR endogène par infection adénovirale. Les lignées murines JMO1 et H-59 ont été infectées par différents adénovirus recombinants exprimant seulement la DsRed (AdDsRed), le hp2 (Adhp2), la GFP seule (AdGFP), l'antisens de 309pb à IGF-IR (AdIGF-IR(AS) 309), l'antisens pleine longueur à IGF-IR (AdIGF-IR-(AS) et différents antisens à IGF-IR issus du criblage de la librairie (P1/P2 AdAS clone*). L'expression de IGF-IR et de la forme phosphorylée de eIF-2 α (P*- eIF-2 α) furent analysées par immunobuvardage (a-b) analyse par Un antisens au récepteur transgénique TGF β R-II induisant une expression importante de P*- eIF-2 α dans des cellules A549 fut utilisé comme contrôle positif (AdASTGF β R-II). La protéine β -actine sert de contrôle du niveau de protéine chargé dans chaque puits.



4-DISCUSSION

L'objectif de notre étude était d'optimiser et de développer des stratégies moléculaires permettant de diminuer voire de supprimer spécifiquement l'expression d'IGF-IR. Nous avons pour cela choisi de développer d'une part, des ARN antisens et d'autre part, des shRNAs. Dans le but de sélectionner rapidement des molécules hautement efficaces, nous avons testé l'efficacité de ces molécules dans des essais où le gène cible était surexprimé pour ensuite confirmer leur potentiel inhibiteur sur l'expression de IGF-IR endogène.

Optimisation d'un système de criblage d'une librairie adénovirale d'antisens contre le récepteur IGF-IR.

Afin d'évaluer l'efficacité d'ARNs antisens, l'utilisation de la GFP comme gène rapporteur de l'expression de IGF-IR constituait une méthode idéale de criblage de la librairie générée. La création de la lignée 293CymRIGF-IR était d'ailleurs vouée à cette utilisation et était d'autant plus attrayante qu'il était possible de contrôler l'expression d'IGF-IR par un système de promoteur inductible au cumate. L'utilisation du gène rapporteur GFP dans le cadre du criblage d'une librairie d'antisens s'est avérée être une méthode de criblage préliminaire efficace dans notre laboratoire (résultats non publiés). Nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode en premier lieu. Cependant, un problème majeur auquel nous nous sommes confrontés rapidement était principalement dû à une intensité de fluorescence extrêmement faible émise par la GFP lorsque l'expression d'IGF-IR était induite dans cette lignée. La mise au point d'un système de criblage à haut débit utilisant le gène rapporteur GFP dont la fluorescence pouvait être lue par lecture directe de microplaques 96 puits au Fluorimager était alors impossible; la fluorescence de la GFP ne pouvait être mesurée par cette méthode de lecture.

Nous avons donc opté pour une mesure de l'intensité de fluorescence par cytométrie en flux. La fluorescence de la GFP résiduelle était mesurée après infection par différents clones adénoviraux co-exprimant antisens et GFP suivie d'une induction du transgène IGF-IR/GFP. En se basant sur les résultats obtenus à l'issue de la co-transfection des constructions AS/GFP et IGF-IR/GFP dans des cellules 293A, une corrélation directe entre la mesure de la fluorescence émise par la GFP et l'efficacité de l'AS a été vérifiée dans le cas précis où les concentrations des brins sens et antisens étaient équivalentes (Figure 24). Comme nous l'avons souligné

précédemment, le problème apparaît lorsque le nombre de molécules d'ARN antisens est en excès par rapport au nombre de molécules d'ARN sens. Ainsi, une absence de réduction de la fluorescence GFP globale ne reflète pas alors forcément une inefficacité de la molécule testée. L'expérience de détection de IGF-IR par immunocytochimie (Figure 26-a) a démontré qu'en se basant uniquement sur une analyse de l'expression de la GFP, il était difficile de conclure sur l'efficacité réelle des antisens testés. En effet, certains peuvent apparaître comme des faux-négatifs c'est à dire des clones efficaces, capables de réduire l'expression de IGF-IR (mesurée par une réduction de la fluorescence PE), mais ne réduisant aucunement l'expression de la GFP. Il est clair que pour certains clones, la mesure de la GFP correspondait à leur efficacité réelle. L'utilisation de la GFP comme gène rapporteur dans ce système de criblage aurait supposé une double analyse pour chaque clone ce qui n'est pas compatible avec des centaines de clones à analyser rapidement. Il aurait été possible d'utiliser ce système de criblage (en mesurant la fluorescence de la GFP par cytométrie en flux) si les clones adénoviraux antisens n'avaient pas été construits en configuration dicistronique avec la GFP. Cependant, la présence du gène rapporteur a permis, en plus de la sélection positive par la protéase, de sélectionner plus facilement les clones recombinants lors de la création de la librairie.

Une détection de IGF-IR analysée par cytométrie en flux ne nous est pas apparue non plus comme une solution de choix pour cribler de nombreux clones en raison des manipulations importantes à effectuer avec un marquage indirect par un anticorps polyclonal (un marquage direct avec un anticorps monoclonal couplé à un fluorochrome aurait été plus approprié) et de la difficulté à reproduire les résultats en raison de la faible efficacité du marquage. Il aurait pu être envisagé à ce stade une détection directe de IGF-IR par immunobuvardage; cependant, étant dans un système réplcatif, la détermination d'un volume adéquat de virus permettant d'infecter la majorité des cellules sans causer d'effet cytopathique majeur après 48h s'est avérée difficile, nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation d'un système non-réplcatif.

L'infection de cellules HeLa par des clones adénoviraux antisens suivie de la transfection du gène cible IGF-IR a permis de confirmer que cette méthode de criblage préliminaire, accompagnée d'une détection directe de l'expression de IGF-IR par Immunobuvardage s'avérait efficace. Le criblage de 23 clones adénoviraux en utilisant ce système nous a permis de classer les antisens suivant leur degré d'efficacité de réduction de l'expression du

transgène IGF-IR. Leur potentiel de réduction a par la suite été testé sur le récepteur endogène. Cet ultime test valide la fiabilité de ce criblage préliminaire dans un modèle non-réplicatif avec toutefois quelques limites. Sur les six clones adénovirus sélectionnés, quatre réduisent l'expression d'IGF-IR endogène avec des degrés différents. Les degrés d'efficacité de réduction déterminés sur le gène endogène ne correspondent pas forcément au degré de réduction observé dans les cellules HeLa. De plus, deux antisens capables de réduire efficacement l'expression du transgène IGF-IR n'auront aucune efficacité sur l'expression du récepteur endogène (Figure 33 a-d).

La difficulté de corréler l'efficacité de certains clones sur le transgène IGF-IR surexprimé et sur l'endogène pourrait s'expliquer par une différence de localisation entre les transcrits de IGF-IR transfectés et les transcrits endogènes. L'efficacité d'un antisens est influencée non seulement par la structure secondaire de l'ARNm ainsi que par la présence de protéines de liaison à l'ARN mais aussi par une co-localisation appropriée des brins d'ARN sens et antisens dans un même compartiment cellulaire. La livraison de l'antisens via le vecteur adénoviral ainsi que la livraison du gène par transfection sont probablement colocalisés durant leur transcription permettant une meilleure hybridation d'autant plus favorisée par une concentration importante de molécules. En outre, l'ADNc de IGF-IR utilisé ne comportait pas d'extrémité 5' non codante. Il est clair que la configuration secondaire de la molécule d'ARN formée s'en trouve affectée et ces différences avec la structure secondaire de l'ARN de IGF-IR endogène peuvent expliquer l'hybridation impossible ou de plus faible efficacité d'un antisens donné; l'accessibilité à la séquence constituant un des déterminants majeurs au potentiel antisens.

D'autre part, l'efficacité de réduction de l'expression d'IGF-IR pour un même antisens ou pour le hp2 est parfois variable selon le type cellulaire. Il est nécessaire de souligner que pour une même m.o.i, l'infection des cellules JMO1 semblait plus homogène caractérisée par une expression forte du gène rapporteur GFP d'après une observation en microscopie à fluorescence. L'infection des H-59 n'apparaissait pas aussi homogène, les cellules infectées efficacement (expression importante du gène rapporteur GFP ou RFP) se détachaient alors que les cellules exprimant peu ou pas le gène rapporteur restaient adhérentes. Dans nos conditions expérimentales, nous sommes conscients qu'il est difficile de conclure avec précision sur le degré d'efficacité de réduction de l'expression d'IGF-IR car l'expérience n'a pas été reproduite.

Cependant, cette expérience préliminaire dont le but était de vérifier l'efficacité d'ARN antisens et du hp2 sur le récepteur endogène, nous a permis d'une part, de valider un système de criblage dans un modèle non-répliatif, et d'autre part de valider l'efficacité du hp2.

Criblage de molécules shRNAs par surexpression du transgène IGF-IR associé au gène reporter GFP et efficacité de ces molécules sur le récepteur endogène.

Le criblage de shRNAs par surexpression du transgène cible IGF-IR/GFP a été validé comme étant une méthode efficace pour une sélection rapide de shRNAs (Ogorelkova et al, soumis). D'après nos données, sur les quatre shRNAs testés par transfection transitoire dans des cellules 293A (Figure 29), l'effet de "*silencing*" remarquable du hp2 sur l'expression du transgène IGF-IR a pu être reproduit sur le récepteur endogène. L'efficacité du hp2 fut également confirmée par l'utilisation de vecteurs d'expression différents. En effet, le hp2 exprimé par un vecteur adénoviral a démontré son efficacité à réduire l'expression de IGF-IR surexprimé (Figure 31) ou endogène (Figure 33). L'utilisation d'un vecteur lentiviral exprimant le hp2 a également été envisagée en raison de la facilité à créer des lignées cellulaires arborant spécifiquement une délétion stable d'IGF-IR. Conduisant à une intégration stable et de longue durée du transgène désiré, les lentivirus constituent un avantage clé comparé à des systèmes d'expression transitoires ou moins stables. En effet, un des avantages attrayant dans l'utilisation des vecteurs lentiviraux est leur grande efficacité de transduction grâce entre autre, à l'utilisation de l'enveloppe VSVg (86). Cette caractéristique permet d'éviter les effets dus à une sélection clonale c'est à dire la sélection de clones dont le phénotype est différent de la cellule parentale. En raison de la facilité de transduction de nombreux types cellulaires par un vecteur LV pseudotypé avec VSV-G (20), nous avons en premier lieu décidé de transduire les deux lignées cellulaires avec des stocks de virus non-concentrés.

La faible efficacité de transduction observée dans les deux types cellulaires aussi bien avec le LVDsRed qu'avec le LVhp2 pourrait s'expliquer par des concentrations faibles de lentivirus produits. En outre, nous avons obtenu une meilleure efficacité de transduction par le LVDsRed que par le LVhp2 dans les deux types cellulaires qui pourrait s'expliquer également par une différence dans la concentration des stocks produits comme le confirme une efficacité de transduction sous-optimale après une première ronde de transduction. Il est possible que le

transgène hp2, en raison de sa séquence palindromique, soit produit avec une plus faible efficacité dans les cellules 293. Les lentivirus pseudotypés avec la glycoprotéine G du virus VSV ont un tropisme très large car leur récepteur est probablement un phospholipide membranaire, composant de la plupart des membranes cellulaires. Cependant, l'inefficacité de transduction des H-59 aussi bien par le LVDsRed que par le LVhp2 en comparaison des cellules humaines 293 pourrait s'expliquer par des résistances naturelles spécifiques aux cellules murines. Nous ne pouvons cependant affirmer si la faible efficacité de transduction n'était qu'apparente et due à une faible expression du gène rapporteur par le promoteur CMV5 dans ces cellules (l'expression par un promoteur CMV dans de nombreux vecteurs est plus faible dans les cellules de rongeurs que dans les cellules humaines). Afin de confirmer cette hypothèse il serait alors nécessaire de choisir un autre promoteur et de mesurer avec précision par des PCR quantitatives ou par Southern-Blot l'intégration du vecteur (53). L'efficacité de transduction ne corrèle pas seulement avec la quantité de récepteur à la surface des cellules mais surtout avec des événements post-liaison allant des mécanismes de fusion membranaire à la migration du complexe de pré-intégration (PIC) au noyau dans lesquels de nombreux facteurs cellulaires rentrent en jeu (51). Certains de ces mécanismes de résistance cellulaires sont saturables et ce problème pourrait donc être résolu par l'utilisation d'une concentration plus élevée de lentivirus. L'obtention d'une transduction de plus faible efficacité après une deuxième ronde de transduction est difficile à interpréter étant donné que les titres des stocks viraux n'ont pas été déterminés. L'observation des cellules H-59 72h-96h après transduction a montré un détachement important des cellules. Bien que les paramètres de transduction aient été optimisés pour diminuer au maximum les effets cytotoxiques (concentration de virus et diminution de la concentration de polybrène de 8ug/mL à 4ug/mL), ces conditions n'ont pas été suffisantes pour améliorer le phénotype cellulaire et les niveaux de transduction dans les H-59. Afin de confirmer l'hypothèse d'une cytotoxicité qui pourrait être causée par le hp2, il serait nécessaire de vérifier s'il y a une activation des gènes de réponse à l'interféron. Une étude récente visant à cibler l'ARNm de PAI-2 (Plasminogen activator inhibitor-2) en utilisant un shRNA sous le contrôle du promoteur U6 exprimé par un vecteur lentiviral dans des lignées cellulaires de tumeur humaines, a montré un effet cytotoxique rapide, effet non lié à une inhibition spécifique de PAI-2 (44). Dans cette même étude, les auteurs soulignent la difficulté à maintenir une expression stable du shRNA à long terme, malgré l'expression permanente

(mais réduite) d'un gène rapporteur dans le vecteur lentiviral. Cette observation pourrait également expliquer une absence de corrélation directe entre la mesure de la fluorescence de la DsRed et le niveau de réduction d'IGF-IR. En effet, la stabilité de l'expression du hp2 devrait être vérifiée par RT PCR afin de s'assurer d'un niveau stable de transcrit indépendamment de l'expression du gène rapporteur DsRed. Afin de s'assurer que la sélection clonale n'a pas aboutit à une sélection de clones 293CymIGF-IR exprimant moins de IGF-IR (ce qui pourrait être confondu avec l'efficacité du hp2), il serait nécessaire également d'utiliser une expression régulable du hp2; une étude a d'ailleurs proposé l'utilisation efficace d'un promoteur U6 inductible à la tétracycline (89;133).

Pour l'instant, les clones 293CymRIGF-IR ne seront pas utilisables car il n'est pas possible de démontrer que la réduction d'IGF-IR mesurée est due à l'expression du hp2. Afin de poursuivre cette étude, une optimisation des paramètres de transduction est nécessaire afin d'augmenter l'efficacité de transduction des cellules H-59 et 293CymRIGF-IR par LVhp2, à défaut, un enrichissement de la population cellulaire (par triage des cellules DsRed positives par FACS) pourrait contourner ce problème majeur dans les H-59.

Spécificité des molécules ARN antisens et shRNAs

Les molécules d'ARNdb de plus de 30pb sont connues pour avoir la capacité d'induire une réponse physiologique complexe caractérisée par une inhibition de la traduction, une dégradation de l'ARNm et une sécrétion d'interférons. Bien que la longueur des shRNAs utilisés soit inférieure à 30pb, il a été démontré une activation des gènes impliqués dans la signalisation aux interférons après la transfection de siRNAs ou l'expression de shRNAs à partir de différents vecteurs d'expression (15;97).

La spécificité des constructions testées doit être validée afin de s'assurer que le potentiel de réduction observé ne soit pas dû à une suppression de la synthèse protéique générale par l'activation de la PKR. Une mesure du niveau de phosphorylation d'un substrat de la PKR, le facteur eIF-2 α , a été réalisée lors de la mesure de l'efficacité des constructions sur IGF-IR endogène (Figure 33). Des différents ARNs antisens exprimés par un vecteur adénoviral, seul l'ARN antisens pleine longueur provoquerait une activation de l'enzyme PKR ce qui s'explique aisément en raison de la taille importante de l'ARNdb formé dans la cellule.

Les conclusions, quant à la spécificité ou non d'un ARN antisens ou d'un shRNA donné ne doivent pas être trop hâtives car il est impossible de garantir la spécificité d'une molécule à 100% et ce, en raison de la complexité de la réponse cellulaire. En effet, la cellule contient au moins trois types de senseurs d'ARNdb : le TLR3 (toll-like receptor 3), la PKR, et des membres de la famille des OSA1 (gènes de réponse aux interférons). Ainsi, l'expression de certains gènes de réponse aux interférons peut avoir lieu sans qu'il y ait activation de la PKR. Dans un système réplcatif, les VA RNA I, transcrits par une ARN polymérase III sont exprimés abondamment durant la phase tardive de l'infection adénovirale afin d'empêcher l'activation de la PKR par l'ARNdb viral. Ils contiennent une tige apicale d'ARNdb qui se lie au site de liaison de l'ARNdb et comportent un domaine central capable d'inhiber la kinase. Cependant, l'utilisation de vecteurs adénoviraux dans un système non-réplcatif ne permet qu'une expression faible de VA RNA et une activation des gènes OSA1 a en plus été quand même observée lors de l'expression de VA RNAI en absence d'activation de la PKR (32;125). De nombreux éléments peuvent être cependant modifiés afin d'atténuer une réponse cellulaire non-spécifique. En premier lieu, il a été montré que les vecteurs d'expression de siRNA contenant le promoteur U6 entraînent une fréquence plus élevée d'induction des gènes stimulés par les IFNs par apport au promoteur H1 (97). De plus, en ce qui concerne les shRNAs, une part importante de la spécificité est liée à la taille de la séquence, l'effet non-spécifique serait plus important avec des shRNAs de plus grande taille. De nombreuses études assistées par ordinateur ont également invoqué que la fonctionnalité des shRNAs n'était pas seulement due aux propriétés de l'ARNm cible mais à des propriétés spécifiques aux siRNA.

Identification de molécules efficaces : de l'*in vitro* à l'*in vivo*

La sélection de molécules montrant une efficacité de réduction de l'expression du récepteur endogène associée à une vérification préliminaire de leur spécificité constitue un point de départ à une caractérisation plus approfondie. Tout d'abord, l'efficacité de réduction de chacun des ARNs antisens exprimés par des vecteurs adénoviraux devra être mesurée après avoir purifié, amplifié et titré avec précision les différents virus sélectionnés. L'effet dose-réponse de la multiplicité d'infection des clones adénoviraux sur l'expression de IGF-IR dans un système non-réplcatif pourra alors être mesuré avec précision. En parallèle, une extraction de l'ADN viral suivi d'un séquençage du fragment antisens nous permettra de conclure quant aux régions

du gène IGF-IR accessibles aux molécules antisens. Ces étapes de caractérisation réalisées préalablement pour quelques clones, il sera alors possible de cribler l'ensemble des clones de la librairie dans les cellules HeLa. Une optimisation possible serait de réaliser la détection d'IGF-IR par Dot-Blot, technique plus rapide que l'immunobuvardage. Un séquençage systématique de centaines de clones ayant des degrés d'efficacité de réduction différents permettra de cartographier les régions du gène IGF-IR accessibles à des molécules antisens.

L'efficacité des shRNAs *in vitro* doit tout d'abord être validée par une normalisation de l'efficacité de transfection par l'utilisation d'un contrôle interne ou par la mesure de niveaux de transcrits (par RT PCR). En parallèle, l'efficacité des shRNAs au niveau protéique pourrait être associée à une vérification au niveau de l'ARNm par Northern-Blot.

Ces vérifications réalisées, ces molécules pourront être validées par différents tests phénotypiques *in vitro* et *in vivo*. Afin de valider ces molécules pour des applications en thérapie génique, il sera possible d'utiliser les cellules H-59 qui dépendent de l'expression d'IGF-IR pour former des métastases dans le foie. Une meilleure efficacité de transduction des H-59 par le LVhp2 ou par un lentivirus exprimant un ARN antisens sélectionné à l'issu du criblage de la librairie, pourra permettre par exemple d'analyser leur croissance en milieu semi-solide (en conditions indépendantes de l'ancrage) et leur motilité après induction par le ligand IGF-I. Une diminution de la capacité des H-59 à former des colonies en agar mou ainsi qu'une diminution de leur capacité à migrer sont des caractéristiques qu'il faudra mettre en évidence pour valider l'efficacité de ces molécules.

In vivo, ces cellules exprimant les molécules antisens ou shRNA devraient avoir un potentiel de migration et de formation de micro-métastases au niveau du foie diminué. Il est important d'ajouter que l'effet d'un antisens peut avoir une inhibition partielle en monocouche cellulaire et très importante *in vivo* d'où l'importance de tester des antisens d'efficacité différentes *in vitro* pour ne pas délaier des molécules intéressantes (3;124).

Conclusion

L'objectif de notre étude consistant à développer des molécules d'ARN antisens et shRNAs permettant de diminuer efficacement l'expression du récepteur IGF-IR endogène fut atteint. La méthode de sélection de ces molécules basée sur la surexpression du gène cible semble efficace afin de sélectionner les deux types de molécules. Il est encore tôt pour prédire si l'utilisation des shRNAs est plus appropriée que les ARN antisens pour des études plus approfondies. Cette étude nous a permis de mettre l'emphasis sur l'importance de l'utilisation de contrôles appropriés en particulier dans l'utilisation de shRNAs. Ces deux types de molécules agissant au niveau du transcrit endogène selon des modes d'action très distincts, nécessitent d'être optimisées afin de minimiser leurs effets non-spécifiques et leur efficacité doit encore être démontrée par des tests phénotypiques avant d'être utilisées *in vivo*.

REFERENCES

- (1) Arai T, Takada M, Ui M, Iba H. Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts. *Virology* 1999;260(1):109-15.
- (2) Baserga R. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 2000;19(49):5574-81.
- (3) Baserga R. Targeting the IGF-1 receptor: from rags to riches. *Eur J Cancer* 2004;40(14):2013-5.
- (4) Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 1995;55(2):249-52.
- (5) Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332(3):F105-F126.
- (6) Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003;107(6):873-7.
- (7) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JSet al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275(5304):1320-3.
- (8) Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx Met al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004;428(6981):431-7.
- (9) Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409(6818):363-6.
- (10) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZet al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;35(3):215-7.
- (11) Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, Playford MP, Riedemann J, Southern EMet al. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Biol Chem* 2003;278(18):15991-7.

- (12) Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):E31-E36.
- (13) Bourbeau D, Zeng Y, Massie B. Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: Adenovirus. In: S.C.Makrides editor. *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. G.BERNARDI ed. 2003p. 109-24.
- (14) Boutros M, Kiger AA, Armknecht S, Kerr K, Hild M, Koch Bet al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 2004;303(5659):832-5.
- (15) Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003;34(3):263-4.
- (16) Brodt P. Characterization of two highly metastatic variants of Lewis lung carcinoma with different organ specificities. *Cancer Res* 1986;46(5):2442-8.
- (17) Brodt P, Samani A, Navab R. Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1101-7.
- (18) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2(3):243-7.
- (19) Buckingham SD, Esmaeili B, Wood M, Sattelle DB. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec No 2:R275-R288.
- (20) Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):8033-7.
- (21) Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(17):9742-7.
- (22) Carmell MA, Zhang L, Conklin DS, Hannon GJ, Rosenquist TA. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 2003;10(2):91-2.
- (23) Caron AW, Massie B, Mosser DD. Use of a micromanipulator for high-efficiency cloning of cells co-expressing fluorescent proteins. *Methods Cell Sci* 2000;22(2-3):137-45.

- (24) Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002;8(11):1454-60.
- (25) Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 2003;425(6956):411-4.
- (26) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263(5148):802-5.
- (27) Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S. Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res* 2002;62(21):6035-8.
- (28) Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(6):657-62.
- (29) Cohen P. Serum insulin-like growth factor-I levels and prostate cancer risk--interpreting the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(12):876-9.
- (30) Cote J, Bourget L, Garnier A, Kamen A. Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring. *Biotechnol Prog*. 1997 Nov-Dec;13(6):709-14.
- (31) Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J*. 2004 Feb;86(2):1234-42.
- (32) Desai SY, Patel RC, Sen GC, Malhotra P, Ghadge GD, Thimmapaya B. Activation of interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase by adenoviral VAI RNA. *J Biol Chem* 1995;270(7):3454-61.
- (33) Ding Y, Lawrence CE. Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res* 2001;29(5):1034-46.
- (34) Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003;17(4):438-42.
- (35) Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(4):318-29.

- (36) Doudna JA, Cech TR. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 2002;418(6894):222-8.
- (37) Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono Det al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72(11):8463-71.
- (38) Eaton RW. p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate. *J Bacteriol* 1997;179(10):3171-80.
- (39) Elahi SM, Oualikene W, Naghdi L, O'Connor-McCourt M, Massie B. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther* 2002;9(18):1238-46.
- (40) Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15(2):188-200.
- (41) Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2002;12(2):89-96.
- (42) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):453-8.
- (43) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
- (44) Fish RJ, Kruithof EK. Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol* 2004;5(1):9.
- (45) Gerolami R, Uch R, Jordier F, Chapel S, Bagnis C, Brechot Cet al. Gene transfer to hepatocellular carcinoma: transduction efficacy and transgene expression kinetics by using retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Gene Ther* 2000;7(9):1286-92.
- (46) Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36(1):59-74.
- (47) Gross JM, Yee D. The type-1 insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase and breast cancer: biology and therapeutic relevance. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(4):327-36.

- (48) Hall IM, Noma K, Grewal SI. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(1):193-8.
- (49) Harborth J, Elbashir SM, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K et al. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003;13(2):83-105.
- (50) Hilleren P, Parker R. mRNA surveillance in eukaryotes: kinetic proofreading of proper translation termination as assessed by mRNP domain organization? *RNA* 1999;5(6):711-9.
- (51) Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J et al. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1999;73(12):10020-8.
- (52) Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 1997;16(9):2294-306.
- (53) Ikeda Y, Collins MK, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Takeuchi Y. Gene transduction efficiency in cells of different species by HIV and EIAV vectors. *Gene Ther* 2002;9(14):932-8.
- (54) Imler JL, Chartier C, Dreyer D, Dieterle A, Sainte-Marie M, Faure T et al. Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther* 1996;3(1):75-84.
- (55) Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 1999;261(1):120-32.
- (56) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21(6):635-7.
- (57) Kafri T, van PH, Ouyang L, Gage FH, Verma IM. A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 1999;73(1):576-84.
- (58) Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2003;30(4):313-21.

- (59) Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS, Tsai LH. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 2004;279(3):1942-9.
- (60) Kim D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* 2000;19(56):6660-9.
- (61) Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000;2(2):170-6.
- (62) Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3(5):454-63.
- (63) Krasnykh VN, Douglas JT, van B, V. Genetic targeting of adenoviral vectors. *Mol Ther* 2000;1(5 Pt 1):391-405.
- (64) Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* 1995;6(12):1575-86.
- (65) Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1415-34.
- (66) Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20(5):500-5.
- (67) LeDoux JM, Landazuri N, Yarmush ML, Morgan JR. Complexation of retrovirus with cationic and anionic polymers increases the efficiency of gene transfer. *Hum Gene Ther*. 2001 Sep 1;12(13):1611-21
- (68) Lehmann MJ, Patzel V, Sczakiel G. Theoretical design of antisense genes with statistically increased efficacy. *Nucleic Acids Res* 2000;28(13):2597-604.
- (69) LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003;195(2):127-37.
- (70) Li Y, Drone C, Sat E, Ghosh HP. Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *J Virol* 1993;67(7):4070-7.
- (71) Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(6):576-7.

- (72) Lippincott Williams & Wilkins. In: Shenk TE, Knipe DM editors. *Field's Virology*. 4th ed. 2001p. 2265-300.
- (73) Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75(1):59-72.
- (74) Lochmuller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B et al. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 1994;5(12):1485-91.
- (75) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- (76) Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 2004;429(6989):318-22.
- (77) Maquat LE, Carmichael GG. Quality control of mRNA function. *Cell* 2001;104(2):173-6.
- (78) Mautino MR. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther* 2002;2(1):23-43.
- (79) Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431(7006):343-9.
- (80) Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson B et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(12):7195-200.
- (81) Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004;5(3):221-30.
- (82) Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998;72(10):8150-7.
- (83) Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15502-7.

- (84) Morin MJ. From oncogene to drug: development of small molecule tyrosine kinase inhibitors as anti-tumor and anti-angiogenic agents. *Oncogene* 2000;19(56):6574-83.
- (85) Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20(19):7146-59.
- (86) Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272(5259):263-7.
- (87) Nemerow GR, Stewart PL. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63(3):725-34.
- (88) Ogorelkova M, Elahi SM, Gagnon D, Massie B. DNA delivery to cells in culture: generation of adenoviral libraries for high-throughput functional screening. *Methods Mol Biol* 2004;246:15-27.
- (89) Ohkawa J, Taira K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum Gene Ther* 2000;11(4):577-85.
- (90) Oualikene W, Massie B. Adenovirus vectors in functional genomics. In: Mohamed Al-Rubeai editor. *Cell Engineering*. Vol 2. Kluwer Academic Publishers; 2000p. 80-154.
- (91) Oualikene W, Lamoureux L, Weber JM, Massie B. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* 2000;11(9):1341-53.
- (92) Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16(8):948-58.
- (93) Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(3):1443-8.
- (94) Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 2004;428(6981):427-31.

- (95) Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):13565-70.
- (96) Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380(6572):364-6.
- (97) Pebernard S, Iggo RD. Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* 2004;72(2-3):103-11.
- (98) Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, Stoeckli ET. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* 2003;21(1):93-6.
- (99) Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano Get al. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19(10):7203-15.
- (100) Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:177-211.
- (101) Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:491-532.
- (102) Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 2004;363(9418):1346-53.
- (103) Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004;22(3):326-30.
- (104) Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998;80(1):35-47.
- (105) Rubin R, Baserga R. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab Invest* 1995;73(3):311-31.
- (106) Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 11):2573-604.
- (107) Samani AA, Fallavollita L, Jaalouk DE, Galipeau J, Brodt P. Inhibition of carcinoma cell growth and metastasis by a vesicular stomatitis virus G-pseudotyped

retrovector expressing type I insulin-like growth factor receptor antisense. *Hum Gene Ther* 2001;12(16):1969-77.

- (108) Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M, Cerisano Vet al. Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther* 2002;9(3):296-307.
- (109) Sczakiel G. The design of antisense RNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7(4):439-44.
- (110) Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis Tet al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994;14(6):3604-12.
- (111) Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type I insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(23):11217-21.
- (112) Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47(3):235-53.
- (113) Shaw LC, Afzal A, Lewin AS, Timmers AM, Spoerri PE, Grant MB. Decreased expression of the insulin-like growth factor 1 receptor by ribozyme cleavage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(9):4105-13.
- (114) Shichinohe T, Bochner BH, Mizutani K, Nishida M, Hegerich-Gilliam S, Naldini Let al. Development of lentiviral vectors for antiangiogenic gene delivery. *Cancer Gene Ther* 2001;8(11):879-89.
- (115) Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 2003;426(6964):310-4.
- (116) Silva JM, Hammond SM, Hannon GJ. RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? *Trends Mol Med* 2002;8(11):505-8.
- (117) Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel Let al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000;96(13):4103-10.
- (118) Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard Det al. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells,

including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 2001;3(4):438-48.

- (119) Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003;5(9):834-9.
- (120) Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C et al. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 1988;263(23):11486-92.
- (121) Stein P, Svoboda P, Schultz RM. Transgenic RNAi in mouse oocytes: a simple and fast approach to study gene function. *Dev Biol* 2003;256(1):187-93.
- (122) Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol* 2003;3(11):851-8.
- (123) Sun HZ, Wu SF, Tu ZH. Knockdown of IGF-IR by Antisense Oligodeoxynucleotide augments the sensitivity of bladder cancer cells to mitomycin. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22(9):841-6.
- (124) Surmacz E. Growth factor receptors as therapeutics targets: strategies to inhibit the insulin-like growth factor I receptor. *Oncogene* 2003;22(42): 6589-97
- (125) Svensson C, Akusjarvi G. Adenovirus VA RNAI mediates a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs. *EMBO J* 1985;4(4):957-64.
- (126) Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2001;2(4):239-45.
- (127) Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986;5(10):2503-12.
- (128) Umana P, Gerdes CA, Stone D, Davis JR, Ward D, Castro M et al. Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol* 2001;19(6):582-5.
- (129) Vehara H. Effects of blocking platelet-derived growth factor receptor signaling in a mouse model of prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:558-70.

- (130) Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004;303(5658):672-6.
- (131) Wang Q, Finer MH. Second-generation adenovirus vectors. *Nat Med* 1996;2(6):714-6.
- (132) Weiss B, Davidkova G, Zhou LW. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(3):334-58.
- (133) Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 2003;77(16):8957-61.
- (134) Wu Y, Cui K, Miyoshi K, Hennighausen L, Green JE, Setser J et al. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Res* 2003;63(15):4384-8.
- (135) Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(18):1472-89.
- (136) Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 2002;296(5571):1265-9.
- (137) Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25-33.
- (138) Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(17):9779-84.
- (139) Zhang D, Brodt P. Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene* 2003;22(7):974-82.
- (140) Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S et al. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):135-40.
- (141) Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999;73(4):2886-92.

- (142) Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. J Virol 1998;72(12):9873-80.
- (143) Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. Nat Biotechnol 1997;15(9):871-5.
- (144) Zuker M, Jacobson AB. Using reliability information to annotate RNA secondary structures. RNA 1998;4(6):669-79.

